

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



**Comparación de la actividad hemolítica y fosfolipásica A2 de
Trichomonas vaginalis cultivada en presencia y ausencia de
vitaminas 107 Diamond**

**TESIS QUE EN OPCIÓN AL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS CON
ACENTUACION EN MICROBIOLOGIA**

**PRESENTA: Q.F.B. JESSICA LYSSETTE RODRIGUEZ GARCIA
2014**

**COMPARACIÓN DE LA ACTIVIDAD HEMOLÍTICA Y
FOSFOLIPÁSICA A2 DE *Trichomonas vaginalis* CULTIVADA
EN PRESENCIA Y AUSENCIA DE VITAMINAS 107 DIAMOND**

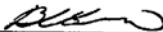
Comité de Tesis



Director Interno Dr. Mario Rodolfo Morales Vallarta



Secretario Dra. María Porfiria Barrón González



Vocal 1 Dr. Benito David Mata Cárdenas



Vocal 2 Dr. Javier Vargas Villarreal



Vocal 3 Dr. Feliciano Segovia Salinas

DEDICATORIA

A Dios, por haberme permitido llegar a este día. Por la compañía y guía en mi vida profesional. A mis Padres, Hermano y Amigos, por su apoyo en esta etapa de mi vida, por su esfuerzo, consejo que siempre me brindan y celebran los triunfos a mi lado. A mis asesores por su ayuda, tiempo y motivación; por alentarme, corregirme y guiarme.

Jessica Lyssette Rodríguez García

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Dios por protegerme durante todo mi camino y darme fuerzas para superar obstáculos y dificultades a lo largo de toda mi vida.

A mis Padres, Rosa María García Tapia y Jesús Rodríguez Domínguez, mi Hermano, Christian Emmanuel Rodríguez García; que me han permitido no desfallecer ni rendirme ante nada y siempre perseverar a través de sus sabios consejos.

A mis Amigos, Mónica Acosta y Martín Valdez, por su apoyo brindado en la elaboración de esta Tesis y por demostrarme la gran fe que tienen en mí.

A mi Mamá, motivo de mi superación; por acompañarme durante todo este arduo camino y compartir conmigo alegrías y fracasos; que con su apoyo y cariño incondicional me ha enseñado que se pueden lograr los sueños.

A mi Hermanita Cindy, por contagiarme de su energía y acompañarme en mis desvelos.

A mis Asesores, por su enseñanza, asesoría, observaciones, su valioso apoyo brindado en la realización de este trabajo de tesis.

Gracias a todas las personas que ayudaron directa e indirectamente en la realización de este proyecto.

ÍNDICE

	PÁGINA
1. Introducción	1
2. Antecedentes	2
2.1 Generalidades sobre <i>T. Vaginalis</i>	2
2.2 Características biológicas de <i>T. Vaginalis</i>	2
2.3 Taxonomía	6
2.4 Epidemiología	7
2.5 Manifestaciones clínicas	8
2.6 Diagnóstico	8
2.7 Tratamiento	9
2.8 Factores de virulencia y patogénesis	10
2.9 Características de las Fosfolipasas	10
2.9.1 Clasificación de las Fosfolipasas	11
2.10 Vitaminas	14
3. Hipótesis	16
4. Objetivos	17
4.1 Objetivo general	17
4.2 Objetivos específicos	17
5. Material y Métodos	19
5.1 Origen de los Reactivos	19
5.2 Material Biológico	20
5.2.1 Cepa de <i>T. vaginalis</i> GT-15	20
5.2.2 Suero Bovino	20
5.3 Medios de Cultivo	21
5.3.1 Medio Base PEHPS-CV o PEHPS-SV	22
5.3.2 Medio Completo PEHPS-CV o PEHPS-SV	22
5.4 Soluciones de Trabajo	22
5.4.1 PBS 10X	22

5.4.2 SSB	22
5.4.2.1 SSB 10X	22
5.4.2.2 SSB 1X	23
5.4.3 MgCl ₂ 10mM	23
5.4.4 EDTA 10mM	23
5.4.5 Tritón X 100 al 4%	23
5.4.6 Tris-HCl (10X)	24
5.4.7 Solución concentrada de enzima pura de <i>B. cereus</i>	24
5.4.8 Diluciones de enzima pura total de <i>B. cereus</i>	24
5.4.9 Mezcla de ensayo para la actividad fosfolipasa A2	24
5.4.10 Mezcla para detener la reacción	24
5.4.11 Fase móvil para Cromatografía en Placa Fina	25
5.4.12 Fase móvil para Cromatografía en Placa Fina Bidireccional	25
5.5 Tratamiento del material para cultivo	25
5.5.1 Lavado de tubos de cultivo	25
5.5.2 Lavado de pipetas serológicas	26
5.6 Tratamiento de material para Cromatografía	26
5.6.1 Lavado y Secado	26
5.7 Mantenimiento de la Cepa	27
5.7.1 Obtención de los extractos celulares	27
5.7.1.1 Obtención de Extracto Total (ET)	27
5.7.1.2 Obtención de Extracto P30 y S30	27
5.8 Obtención de eritrocitos de rata	28
5.9 Cuantificación de la Actividad Hemolítica	29
5.10 Método para determinar la actividad fosfolipásica	30
5.11 Cuantificación de Proteínas	31
6. Resultados	32
6.1 Cinética de crecimiento de la cepa GT-15 cultivada en presencia y ausencia de vitaminas 107 Diamond	32

7. Discusión	41
8. Conclusiones	46
9. Perspectivas	47
10. Bibliografía	48

COMPARACIÓN DE LA ACTIVIDAD HEMOLÍTICA Y FOSFOLIPÁSICA A₂ DE *Trichomonas vaginalis* CULTIVADA EN PRESENCIA Y AUSENCIA DE VITAMINAS 107 DIAMOND. Elaborado por Q.F.B. Jessica Lyssette Rodríguez García

RESUMEN

Trichomonas vaginalis es el agente causal de la tricomoniasis. Su mecanismo de patogenicidad de *T. vaginalis* aún se desconocen en su mayor parte, sin embargo se han asociado algunas actividades hemolíticas de fosfolipasas A con su capacidad invasiva, los cuales se constituyen como los principales factores de virulencia. Las fosfolipasas A son factores líticos, estos factores son conocidos como hemolisinas por sus propiedades biológicas que han sido estudiadas primeramente usando eritrocitos. *T. vaginalis* cuando crece en el medio PEHPS es indispensable suplementarlo con suero bovino, necesario para su crecimiento, otro suplemento son las vitaminas 107 de Diamond. Hasta la fecha, no existen reportes sobre la contribución de las vitaminas en la expresión y producción de los factores involucrados en virulencia de este protozoario. En este proyecto comparamos la actividad hemolítica y fosfolipásica A₂ en las fracciones P30, S30 y Extracto Total a pH 8 de trofozoítos de *Trichomonas vaginalis* cultivados en presencia y ausencia de vitaminas, mediante la siguiente Metodología 1.- Utilizamos la cepa GT-15 de *T. vaginalis* en medio PEHPS-CV y PEHPS-SV, además de los cultivos masivos de tricomonas en suspensión. 2.- Elaboramos curvas de crecimiento de *T. vaginalis* cepa GT-15 en presencia y en ausencia de vitaminas 107 de Diamond. 3.- Obtuvimos la fracción Extracto total, fracción P30 y fracción S30 de la cepa GT-15 a pH 8 cultivada en PEHPS-CV y PEHPS-SV. 4.- Cuantificamos las proteínas mediante el método de Lowry. 5.- Obtuvimos los eritrocitos de Humano. 6.- Cuantificamos la actividad hemolítica, de las fracciones obtenidas en PEHPS-CV y PEHPS-SV en cuanto al tiempo y la dosis para obtener la dosis hemolítica 50 (DH₅₀). Mediante la liberación porcentual de hemoglobina, a los eritrocitos les ajustamos los volúmenes de mezclas de ensayo con SSB (control negativo), con concentraciones de las fracciones: P30, S30 y ET obtenida en presencia o ausencia de las vitaminas 107 de Diamond. 7.- Determinamos la actividad Fosfolipásica tipo A₂ de las fracciones P30, S30 y Extracto total en cuanto al tiempo y la dosis en PEHPS-CV y PEHPS-SV, utilizamos el método de radioensayo, separamos los lípidos mediante cromatografía en placa fina. Se determinó la radiactividad presente en las manchas y determinamos la radioactividad usando un espectrofotómetro de centelleo líquido. Encontrando que el máximo crecimiento es a las 48 horas de incubación con un inóculo de 5,000 trofozoítos/ml, observamos que no hay diferencia estadísticamente significativa entre la presencia y ausencia de vitaminas 107 de Diamond en el crecimiento de trofozoítos de *Trichomonas vaginalis*. Al incubar a 37 °C. por tiempos variables con 150 µg. de proteína total de P30, S30 y ET de PEHPS-SV y PEHPS-CV, encontramos que la liberación de [¹⁴C]AGL (correspondiente a la actividad fosfolipásica de tipo A₂) se incrementó linealmente en función del tiempo de incubación. Alcanzando en ambos tratamientos 60 min como máxima actividad, mayores tiempos no produjo un aumento en dicha actividad. Es de llamar la atención que las fracciones ET, P30 y S30 obtenidos con vitaminas fue 1.84 veces más activo que el obtenido sin vitaminas. Encontramos que el ET, P30 y S30 con ambos tratamientos se incrementaron linealmente con respecto a diferentes concentraciones de proteína total entre 0 y 150 µg, donde observamos que las fracciones proveniente de PEHPS-CV fue 1.87 veces mayor en su actividad que las fracciones obtenidas del medio PEHPS-SV. Con las fracciones ET, P30 y S30 se encontró que la proteína obtenida del medio PEHPS-CV no presentó una fase Lag en su actividad hemolítica y su máxima liberación de hemoglobina fue a las 4.5 hr. Las fracciones obtenidas del medio PEHPS-SV presento una fase Lag de 1 hr, tiempos más largos se presentó una fase lineal alcanzando el 100% de hemoglobina liberada a las 6 hr de incubación.

COMPARISON OF THE ACTIVITY HEMOLYTIC AND PHOSPHOLIPASE A2 *Trichomonas vaginalis* OF GROWN IN PRESENCE AND ABSENCE OF VITAMINS 107 DIAMOND
Prepared by Q.F.B. Jessica Lyssette Rodríguez García

ABSTRACT

Trichomonas vaginalis is the causative agent of trichomoniasis. The mechanism of pathogenicity of *T. vaginalis* still largely unknown, however some activities have been associated (like haemolytic activities and phospholipase A) with their invasiveness, which constitutes the main virulence factors. Phospholipases A lytic factors, these factors are known as hemolysins by their biological properties, they have been studied primarily using red cells. *T. vaginalis* when grown in the medium PEHPS is essential supplementing with bovine serum necessary for growth, other supplements are 107 Diamond vitamins. To date there are no reports on the contribution of vitamins in the expression and production of virulence factors involved in this protozoan. This project compared the hemolytic and phospholipase A2 activity in fractions P30, S30 and ET at pH 8. Were obtained total trophozoites of *Trichomonas vaginalis* cultured in the presence and absence of vitamins, using the following methodology 1.-Cultured GT-15 strain of *T. vaginalis* in PEHPS-CV and PEHPS-SV medium, in addition to the massive cultures of trichomonas in suspension. 2.- Were construct growth curves of GT-15 strain of *T. vaginalis* in the presence and absence of 107 Diamond vitamins. 3.- We obtained the Total Extract fraction, P30 and S30 fraction of strain GT-15 of *T. vaginalis* grown at pH 8 in PEHPS-CV and PEHPS-SV. 4.-Protein was quantified by the method of Lowry. 5.- Human erythrocytes was obtained. 6.- Quantify the hemolytic activity of the fractions obtained and PEHPS-CV and PEHPS-SV in terms of time and dose, to obtain (DH50). With the release percentage of hemoglobin, red blood cells we adjust them volumes of test mixtures with SSB (negative control), with concentrations of fractions: P30, S30 and ET obtained in the presence or absence of 107 Diamond vitamins. 7.- Determined the phospholipase A2 activity of fractions P30, S30 and Total Extract in terms of time and dose, we use the method of radioassay, lipids separated by TLC plate. Radioactivity was determined on the stains and the radioactivity determined using a liquid scintillation spectrophotometer. We found that the maximum growth is at 48 hours of incubation, giving an inoculum of 5.000 trophozoites / mL, we observed no statistically significant difference between presence and absence of 107 Diamond vitamins in the growth of *Trichomonas vaginalis* trophozoites. When incubated at 37 ° for varying times with 150 micrograms of total protein P30, S30 and ET in PEHPS-CV and PEHPS-SV, we find that the release of [¹⁴C] GLA (corresponding to the type phospholipase A2 activity) increased linearly with incubation time. Both treatments reaching 60 min peak, longer produced no increase in the activity. It is remarkable that the fractions ET, P30 and S30 obtained with vitamins were 1.84 times more active than that obtained without vitamins. We found that ET, P30 and S30 in both treatments increased linearly with respect to different total protein concentrations between 0 and 150 µg, where we observed that the fractions from PEHPS-CV was 1.87 times higher in activity than the fractions obtained from PEHPS-SV. With fractions ET, P30 and S30 were found that the protein obtained from PEHPS-CV medium not show a phase lag in its hemolytic activity and maximum hemoglobin release was to the 4.5 hr. The fractions obtained from PEHPS-SV introduce a phase lag of 1 hr and presents a linear phase reaching 100% of hemoglobin released after 6 hr of incubation.

1. INTRODUCCIÓN

Trichomonas vaginalis (*T. vaginalis*) es el agente causal de la tricomoniasis, es un protozoo parásito flagelado. Este protozoo se transmite sexualmente y afecta al 12.0% de los hombres y al 16.0% de las mujeres en el mundo. Los trofozoítos producen una infección en el tracto urogenital tanto en mujeres como en hombres, produciendo en las mujeres vaginitis (irritación vulvo vaginal, dolor abdominal y desechos con mal olor) y uretritis en ambos (irritación uretral y dolor al orinar). Además se le ha atribuido a mujeres que presentan esta enfermedad, un bajo peso de sus bebés al nacer y como cofactor en la transmisión y adquisición del HIV. Se estima que *T. vaginalis* infecta anualmente a 170 millones de personas en el mundo y de 5 a 10 millones de personas en Estados Unidos, en México se ha reportado una incidencia del 108 infectados por cada 100,000 habitantes.

Las fosfolipasas A son importantes factores citolíticos de protozoarios parásitos como *E. histolytica*. Estos factores son generalmente conocidos como hemolisinas por sus propiedades biológicas que han sido estudiadas primeramente en eritrocitos. Se ha analizado previamente la actividad hemolítica directa de las fracciones subcelulares P30 y S30 de *T. vaginalis*, y encontramos que solo P30 liso a los eritrocitos de rata y humano. Esto sugiere que esta actividad es debido a la fosfolipasa A2, la cual produce un efecto hemolítico clásico que es responsable para la hemólisis contacto dependiente.

El propósito de este estudio es investigar si la actividad de fosfolipasa A2 en la fracción particulada subcelular P30, en la fracción subcelular soluble S30 de *T.vaginalis* y en el extracto total se ve afectada, cuando *T. vaginalis* se cultiva en presencia o en ausencia de vitaminas.

2. ANTECEDENTES

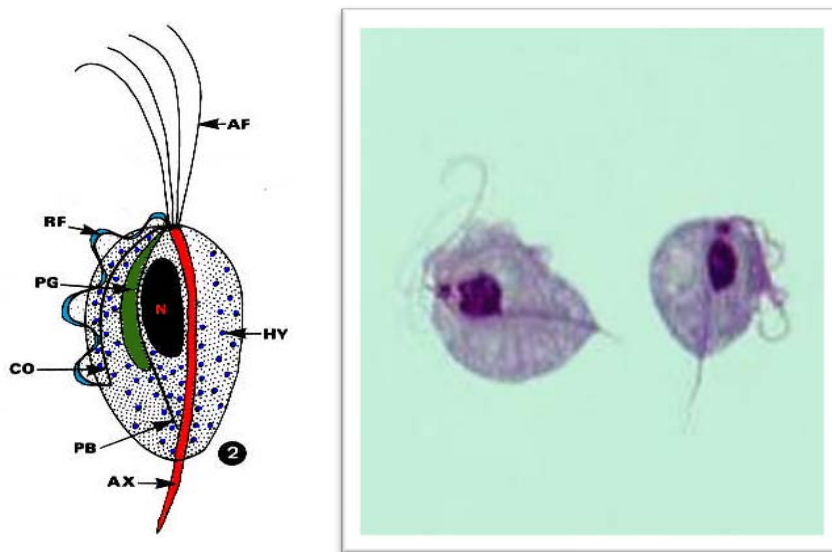
2.1 Generalidades sobre *T. vaginalis*

T. vaginalis es un protozoo parásito flagelado agente causal de la tricomoniasis. Este protozoo se transmite sexualmente y afecta al 12 % de los hombres y al 16% de las mujeres en el mundo. Los trofozoítos producen una infección en el tracto urogenital tanto en mujeres como en hombres, produciendo en las mujeres vaginitis (irritación vulvo vaginal, dolor abdominal y desechos con mal olor) y uretritis en ambos (irritación uretral y dolor al orinar). Además se le ha atribuido a mujeres que presentan esta enfermedad, un bajo peso de sus bebés al nacer y como cofactor en la transmisión y adquisición del HIV (Sorvillo, 2001). Se estima que *T. vaginalis* infecta anualmente a 170 millones de personas en el mundo y de 5 a 10 millones de personas en Estados Unidos (Sorvillo, 2001), en México, según la SSA, se ha reportado una incidencia del 108 infectados por cada 100,000 habitantes (2006).

2.2. Características biológicas de *T. vaginalis*

En cultivo este parásito es típicamente piriforme, aunque formas ameboides se han observado del parásito adhiriéndose a tejido vaginal *in vivo* (Nielsen y Nielsen 1975; González *et al.*, 1995). El microorganismo es microaerofílico, presenta dos estadíos: **a)** el flagelar (crecimiento) y **b)** el trofozoíto (duplicación) (Mata-Cárdenas, *et al.*, 1998). No se conoce hasta la actualidad una forma de resistencia o quiste (Sorvillo, *et al.*, 2001). En su forma flagelar este protozoo mide de 7 a 30 micras de largo y de 5 a 15 micras de ancho, poseen 4 flagelos anteriores con arreglo $[9(2) + 2]$ (Honigberg y King,

1964) y un flagelo recurrente en el borde exterior de la membrana ondulante, que le confieren al parásito la motilidad espasmódica característica (Petrin *et al.*, 1998). Presenta un núcleo grande, ovalado, excéntrico y localizado en el extremo anterior, un citoplasma rico en carbohidratos, con gran número de vacuolas (incluyendo liposomas) (Costamagna, 2001; Llop, 2001; Alderete, 2002). Posee hidrogenosomas y un axostilo que corre a lo largo del parásito (Fig. 1). Su división es por fisión binaria longitudinal. Su pH óptimo de crecimiento es de 5.5 a 7.0 y su temperatura óptima es de 37 °C (Costamagna *et al.*, 2001). Se ha documentado que este protozoario, es uno de los más resistentes a la acción osmótica del agua libre de sales (Madigan *et al.*, 1997).

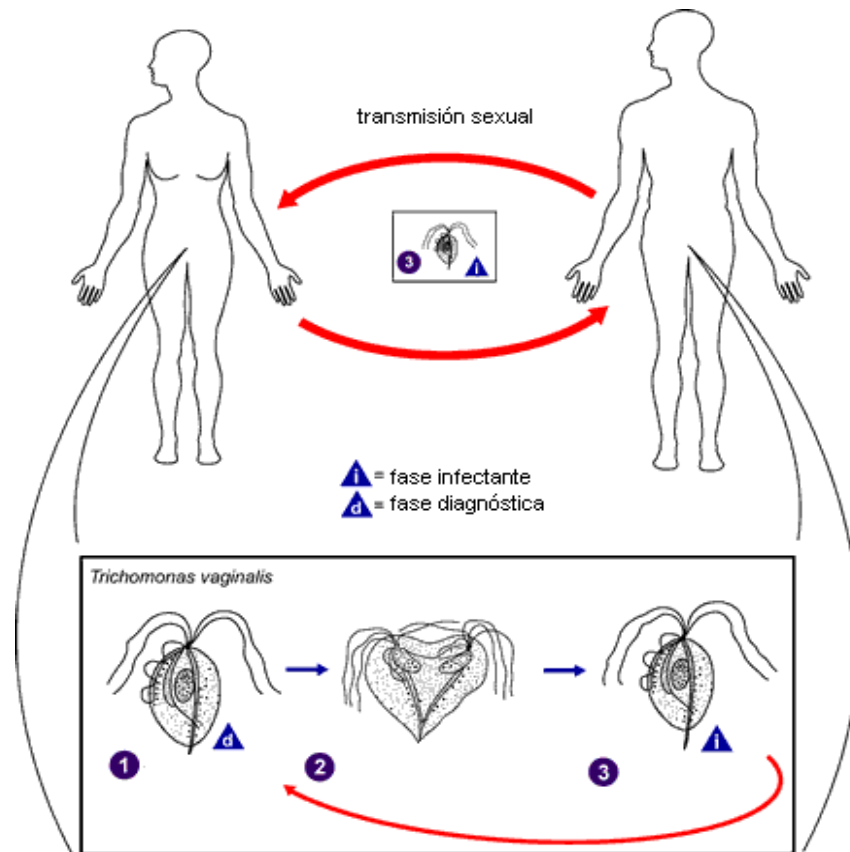


Brugerolle & Lee 2000

Fig. 1. Dibujos y fotografía del trofozoíto de *T. vaginalis*

El ciclo biológico de *T. vaginalis* es relativamente simple donde los trofozoítos son transmitidos a través del coito. Los quistes no se han encontrado hasta ahora observándose solo el estado de trofozoíto, sin embargo aunque carece de formas de resistencia, la quitina asociada a estructuras de superficie le permiten sobrevivir en condiciones ácidas (pH 4.0-4.5). De esta manera *T. vaginalis* vive en el moco vaginal y en la secreción ventral de la mujer,

además vive en la uretra, próstata y epidídimo del hombre (Fig. 2) (Alderete *et al.*, 2002).



- 1 Trofozoítos en secreciones vaginales, prostáticas y en orina.
- 2 Multiplicación por fisión binaria longitudinal.
- 3 Trofozoíto en vagina y en orificio de la uretra.

Image credit: CDC/Alexander J. da Silva, PhD/Melanie Moser (PHIL #3426), 2002. Figura 2 Ciclo de vida de *T. vaginalis*

T. vaginalis no posee mitocondrias, pero sí hidrogenosomas, que son organelos sin ADN formados por 3 gránulos cromáticos (Lindmark y Muller, 1973; Alderete *et al.*, 2002). Algunos investigadores sugieren que el hidrogenosoma es una modificación de la mitocondria, otros sugieren que

ambos provienen de un organelo común (Cavalier, 1987; Gunderson, 1995; Bui *et al.*, 1996; Dyall, y Jonson, 2000). Brown y col. en 1998 plantean que este protozoo es anaerobio microaerotolerante, presentando el sistema enzimático de la piruvato ferredoxina oxidoreductasa (PFO), reemplazando la piruvato deshidrogenasa de organismos aerobios (Brown *et al.*, 1998). Esta vía metabólica activa drogas como los 5-nitroimidazoles y ha sido encontrada en bacterias anaerobias susceptibles al metronidazol, pero no en otros eucariotas, por lo que se considera a *T. vaginalis* como un eucariota primitivo (Upcroft y Upcroft, 1999). Los requerimientos energéticos los provee la transformación de glucosa a glicerol y a succinato en el citoplasma, seguido por la ulterior conversión de piruvato y malato a hidrógeno y acetato, en los hidrogenosomas (Muller, 1993, 1998).

En estudios de ultraestructura de *T. vaginalis* utilizando técnicas como microscopía electrónica de barrido (MEB) y microscopía electrónica de transmisión (MET), se ha observado que posee numerosos hidrogenosomas alineados debajo de la membrana ondulante y a lo largo del axostilo, mostrando importantes depósitos electro-densos a modo de opérculo en cada uno (Nielsen, M., 1975). Se ha demostrado además que utiliza los fenómenos de micropinocitosis asociados con vesículas con cubierta como mecanismo habitual de endo y exocitosis selectiva, mientras que para partículas mayores la fagocitosis es frecuentemente vista. Con referencia al citoesqueleto, los microtúbulos que recorren el parásito son numerosos, conformando estructuras diversas (Costamagna *et al.*, 2001).

2.3 Taxonomía

Siguiendo la taxonomía según Dyer (Dyer, *et al.*, 1990), *T. vaginalis* se clasifica en:

Clasificación Taxonómica			
Reino	<i>Protista</i>	Orden	<u><i>Trichomonadida</i></u>
Subreino	<i>Protozoa</i>	Familia	<u><i>Trichomonadidae</i></u>
Phylum	<i>Zoomastigina</i>	Género	<u><i>Trichomonas</i></u>
Clase	<i>Parabasalia</i>	Especie	<u><i>Trichomonas vaginalis</i></u>

La familia *Trichomonadidae*, presenta tres especies que parasitan al humano: *T. vaginalis*, descubierta en 1836 por Donné (Collard, 1985) y crea en este mismo año el género taxonómico y se descubre que solo coloniza cavidades urogenitales; *T. tenax* descubierta por Dobell en 1939 (Dobell, C., 1939) y clasifica a este protozooario, encontrándolo solo en la cavidad bucal y *T. hominis* descubierta por Davaine en 1854 (Collard, 1985), donde solo coloniza el intestino grueso. De estas especies la más importante por ser la única patógena es *T. vaginalis*.

Trichomonas vaginalis, fué descrito por primera vez por Donné en 1836 (Markell *et al.*, 1990). Años más tarde, en 1916, Hoehne demostró que este parásito era el responsable de un tipo de infección vaginal específica (Markell *et al.*, 1990) y desde ese tiempo hasta la fecha es de interés en la investigación y los blancos terapéuticos para que este parásito sea controlado y/o erradicado.

Los estudios de secuenciación del gen que codifica la subunidad pequeña (18S rRNA) utilizados en los sistemas actuales de clasificación molecular, han permitido la identificación de varios genotipos en esta especie, lo que ha hecho la taxonomía de este protozoario aún más complicada (Viscoglios *et al.*, 1999). El cariotipo de *T. vaginalis* ha sido descrito como haploide con 6 cromosomas y diploide con 12 cromosomas (Drmota, 1997; Yuh, *et al.*, 1997). Este parásito carece de vías metabólicas para sintetizar ácidos grasos, fosfolípidos y esteroides por lo que utiliza fuentes exógenas (Beach *et al.*, 1990, 1991). *T. vaginalis* cuando está vivo tiene un movimiento característico, se desplaza sobre su eje mayor a medida que progresa lentamente, pero, por lo general no se mueve rápidamente de un sitio a otro. Cuando dicho parásito está muriendo, o degenerando, su cuerpo puede volverse más o menos amiboideo; mientras que si está sano tienen el cuerpo en forma de pera con su extremo anterior redondeado y el posterior más puntiagudo. Carece de cistostoma visible y al parecer se alimenta únicamente de nutrientes en solución (Lapage, 1975).

2.4 Epidemiología

La Organización Mundial de la Salud (O. M. S.) estima que esta infección constituye casi el 50% de todas las infecciones curables en todo el mundo y que alrededor de 120 a 180 millones de personas se infectan anualmente (Cates, 1990). En los Estados Unidos se presentan de 5 a 8 millones de enfermedades por año (Cates, 1990 Schwebke, 2002) y de ellos, el 50% de los casos son asintomáticos (Petrin, 1998, Hook, 1999). En México, la tricomoniasis se estima en una tasa de 108 por cada 100,000 habitantes siendo esta enfermedad el número uno en enfermedades transmisibles sexualmente no viral, seguida por la candidiasis (1998).

2.5 Manifestaciones Clínicas

Los síntomas se desarrollan de 4 a 30 días después de la infección; periodos de incubación más cortos se relacionan con una enfermedad más grave (Rein, 1995). La presencia de síntomas es más frecuente e importante en el sexo femenino. En el hombre provoca escasos o nulos síntomas (Llop *et al.*, 2001). La infección se puede presentar de tres formas: vaginitis sintomática, vulvovaginitis aguda o crónica y uretritis (Botero y Restrepo 1992). La manifestación clínica más frecuente es la vulvovaginitis de evolución aguda o crónica y el signo o síntoma más común es la leucorrea que se presenta como una secreción de tipo purulenta y espumosa. Otros síntomas son el prurito vulvar, el ardor y la irritación genital dolorosa, que puede llegar a provocar intensa dispareunia (Llop *et al.*, 2001). En el hombre la tricomoniasis es a menudo asintomática, o puede causar uretritis, prostatitis, cistitis, epidermitis, esterilidad y a veces es responsable de una irritación persistente (Llop *et al.*, 2001).

2.6 Diagnóstico

El diagnóstico está basado en la demostración del parásito. El frotis directo simple del exudado vaginal y la observación al microscopio de la motilidad del protozoo es el método más empleado (Petrin *et al.*, 1998). La sensibilidad de esta técnica varía desde un 38 a un 82% (Martin *et al.*, 1963; Cann, 1974). El material fresco debe ser examinado de inmediato, reconociéndose al parásito por la forma y motilidad espasmódica características. También se les puede ver parasitando algunas células epiteliales, usualmente en grumos (Nuñez, 2001). El cultivo *in Vitro* a partir de secreciones vaginales (en las mujeres) y de sedimento urinario (en los hombres), es la prueba más sensible ya que más del 97% son positivas cuando hay infección y detectan parásitos con inóculos tan pequeños como

1-5 cel/mL (Rein, 1995; Llop *et al.*, 2001). Este método tiene la desventaja de requerir de 2-7 días de incubación, durante ese periodo los pacientes infectados pueden continuar transmitiendo la infección (Moldwin, 1992; Roin, 2001). Se estiman 8 serotipos de *T. vaginalis* (Ackers, 1990). Técnicas como aglutinación, fijación del complemento, hemoaglutinación indirecta, difusión en gel y anticuerpos fluorescentes, han sido usadas para demostrar la presencia de anticuerpos antitricomonas (Teras *et al.*, 1966; Mathews y Healy, 1983; Sibau *et al.*, 1987;). La detección de antígenos monoclonales promete ser un rápido método para el diagnóstico de *T. vaginalis* (Petrin *et al.*, 1998).

2.7 Tratamiento

El tratamiento es difícil debido a la reinfestación constante. Se debe tratar a la pareja. En la mujer hay que restaurar el pH ácido de la vagina ya que *T. vaginalis* no vive en pH de entre 3.8-4.4. Para ello se limpia la vagina con agua y jabón neutro (pueden usarse desinfectantes como el ácido pícrico), así como realizar duchas con una solución débil de ácido láctico para restablecer la flora normal de la vagina (Alderete *et al.*, 2002). El fármaco más utilizado en la actualidad es el metronidazol, (1-(2'-hidroxietil)-2-metil-5-nitroimidazol), es de acción directa, se refleja en una toxicidad selectiva para los microorganismos anaeróbicos o microaerófilos (Goodman y Gildman, 1994; Thompson, 2003). Se usa una dosis única de 2g con una efectividad del 85.0-92.0% o bien empleando dosis de 250mg tres veces al día durante una semana se resuelve alrededor del 95.0% y es el régimen más aceptado para adultos (Rein 1995).

El uso de metronidazol vaginal no debe de considerarse como una terapia alternativa ya que la dosis es inferior a la oral única (Rosenstein, 1996).

Se estima que aproximadamente 2.5 a 5.0 % de todos los casos de tricomoniasis reflejan niveles de resistencia al tratamiento con metronidazol (Schmid *et al.*, 2001).

2.8 Factores de Virulencia y Patogénesis

La adhesión juega un papel importante en la patogénesis de tricomoniasis. Se han identificado varias moléculas de adhesión en la superficie del parásito (Engbring, 1998). Alguna evidencia sugiere que *T. vaginalis* puede producir moléculas que son liberadas a las células blanco y mediar la citotoxicidad a través de daño de la membrana plasmática de la célula blanco. Una de estas moléculas crea poros en las membranas de eritrocitos detectadas por el microscopio electrónico (Fiori 1993).

T. vaginalis tiene la capacidad de destruir monocapas de células epiteliales aisladas de mucosa vaginal por fagocitosis (Rendon, 1998). Se ha encontrado un factor lítico que es liberado por *T. vaginalis* que puede destruir las células nucleadas y eritrocitos y que específicamente degrada a la fosfatidilcolina (Lubick, 2004)

.

2.9 Características de las Fosfolipasas

Las fosfolipasas A son factores líticos importante de protozoarios parásitos tales como *Entamoeba histolytica* (Long-Krug 1985,Vargas, González 2000), *Trypanosoma cruzi* (Wainszlebaum, 2001) y *T. vaginalis* (Vargas, 2003, 2005).

Estos factores son conocidos como hemolisinas por sus propiedades biológicas que han sido estudiadas primeramente usando eritrocitos. A las fosfolipasas se les conoce desde hace 100 años (Dennis, E. A. 1983), pero fue hasta hace 20 que se inició su investigación por la importancia que tienen en ciertos procesos biológicos. Se les ha encontrado tanto dentro como fuera de las células, es por ello que se les a denominando como enzimas muy ubicuas (Van Den Bosch, H. 1980). La mayoría de estas forman parte esencial de diversos procesos fisiológicos como: I) recambio de fosfolípidos en las biomembranas, II) digestión en los fagosomas, III) neurotoxicidad y citotoxicidad en venenos muy activos de hongos, celenterados, insectos, arácnidos y reptiles, IV) en procesos inflamatorios, V) producción de ácidos grasos libres, a partir de los cuales, las ciclooxigenasas sintetizan prostaglandinas, las cuales intervienen en muy diversos mecanismos de regulación celular (Van Den Bosch, H. 1980; Hawthorne, S. N., y Ansell, G. B. 1982; Rosenberg, P. 1976).

2.9.1 Clasificación de las Fosfolipasas

Las fosfolipasas pertenecen al grupo de las hidrolasas y son conocidas con el nombre genérico de esterases (Dennis, E. A. 1983) ya que actúan sobre los enlaces éster de los fosfolípidos (Lehninger, A. L. 1979; Dennis, E. A. 1983). Estas enzimas se dividen en: A1, A2, B, C y D, de acuerdo con la posición del éster que hidrolizan preferentemente (Fig. 3). (Lehninger, A. L. 1979; Dennis, E. A. 1983; Van Den Bosch, H. 1980; Hawthorne, S. N., Ansell, G. B. 1982).

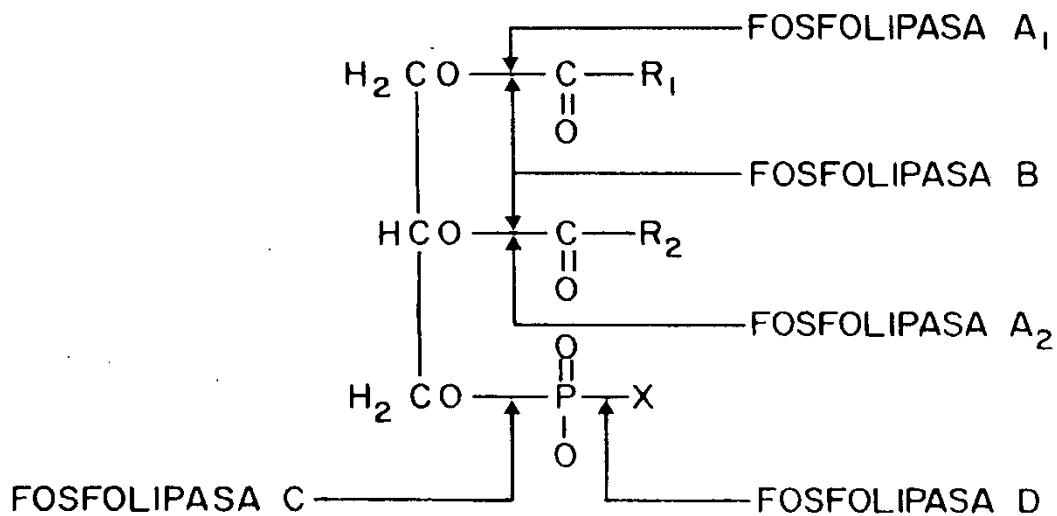


Figura 3. Clasificación de las fosfatidil-acil-hidrolasas, de acuerdo con la posición en la molécula del éster que hidrolizan

I) Tipo A₁ (EC 3.1.1.32); son aquéllas enzimas que hidrolizan la posición sn-1-fosfoglicérido, liberando el ácido graso de la posición 1 y un monoacil-2-glicerofosfátido, en forma equimolar. Estas enzimas se han encontrado en células procarióticas y eucarióticas. En general, son independientes de calcio y requieren un pH ácido ó ligeramente neutro para su funcionamiento (Dennis, E. A. 1983; Van Den Bosch, H. 1980).

II) Tipo A₂ (EC 3.1.1.4); son enzimas lipolíticas que hidrolizan el acilo de la posición 2 de un fosfoglicérido, produciendo un ácido graso y un monoacil-1-glicero-fosfátido, en forma equimolar (Dennis, E. A. 1983). Se han aislado aproximadamente 50 de estas fosfolipasas. Principalmente de páncreas de mamíferos, veneno de serpientes, abejas y diversos microorganismos (Dennis, E. A. 1983; Van Den Bosch, H. 1980; Hawthorne, S. N., Ansell, G. B. 1982; Rosenberg, P. 1976). Se les ha localizado extracelularmente en forma insoluble, asociadas a membranas plasmáticas o lisosomales, o solubles en lisosomas y citosol.

III) Tipo B. Se conocen a este tipo de enzimas como enzimas que rompen simultáneamente los dos ácidos grasos, quedando un gliceril-fosforilcolina. Se les ha encontrado en levaduras, bacterias y hongos. Su pH óptimo es generalmente alcalino (Dennis, E. A. 1983; Van Den Bosch, H. 1980).

IV) Tipo C (EC 3.1.4.3); catalizan la desacilación de diacilglicero-fosfolípidos en 1,2-diacilglicero y fosforilcolina. Son producidas por ciertas bacterias o están asociadas a membrana en células vegetales, algas y levaduras (Dennis, E. A. 1983; Van Den Bosch, H. 1980; Hawthorne, S. N., Ansell, G. B. 1982).

V) Tipo D (EC 3.1.4.4); catalizan la hidrólisis del enlace éster arriba del fosfato, produciendo una molécula de colina y un 1,2-diacilgliceril-fosfátido. Este tipo de enzimas se han encontrado principalmente en plantas, levaduras y bacterias (Dennis, E. A. 1983; Van Den Bosch, H. 1980; Hawthorne, S. N., Ansell, G. B. 1982).

Hemos analizado previamente la actividad hemolítica de fracciones subcelulares denominadas P30 y S30 del extracto de *T. vaginalis* (pastilla y sobrenadante que se obtienen después de centrifugar el extracto total a 30,000 x g) y encontramos que solo la fracción P30 destruyó a los eritrocitos de rata y humano. Esta actividad es máxima a pH 6.0 y pH 8.0 en presencia de 1 mM de Ca^{2+} y fue inhibida por el inhibidor de Rosenthal (Vargas, 2003).

2.10 Vitaminas

La gran meta que tiene un microorganismo es crecer y dividirse; para ello necesita duplicar el material que posee. Los microorganismos utilizan elementos químicos que provienen del medio ambiente para transformarlos en los constituyentes característicos que los componen, a estos compuestos químicos se les llama nutrientes. Cuando los microorganismos se separan de su hábitat (donde adquieren los nutrientes) y se cultivan en laboratorios se deben usar medios de cultivo que contengan los elementos químicos necesarios para su crecimiento y óptimo desarrollo. Los nutrientes que requiere un microorganismo para su crecimiento se pueden clasificar en los siguientes grupos: 1.- Macronutrientes: carbono, hidrógeno, oxígeno y nitrógeno. 2.- Micronutrientes: fósforo, potasio, azufre, magnesio. 3.- Vitaminas y hormonas. 4.- Elementos traza: zinc, cobre, manganeso, molibdeno, cobalto.

Con respecto a las vitaminas, estas se definen como sustancias orgánicas que los microorganismos deben obtener como nutrientes y se clasifican en dos grupos, liposolubles e hidrosolubles, estas últimas, la mayor parte de ellas, son cofactores indispensables para el buen funcionamiento de algunas enzimas. Por lo general se requieren las vitaminas en cantidades muy pequeñas. La mayoría de los microorganismos y animales superiores conservan su energía química, aprovechando la síntesis de estas vitaminas por otros microorganismos e ingiriendo a estos para su obtención, evitando de esta forma el costo bioenergético de biosintetizar las numerosas enzimas que se requieren para producir, mediante el metabolismo, a las vitaminas. (Horton H. R. *et al.* 1995)

T. vaginalis cuando crece en el medio PEHPS es indispensable suplementarlo con suero de bovino, el cual aporta nutrientes necesarios para su crecimiento, hemos observado que los trofozoítos sin la presencia del suero bovino en los medios de cultivo se mueren después de tres días en incubación en forma similar como sucede con *Entamoeba histolytica* (Mata, 1998).

Por otro lado, además del suero en los medios de cultivo, otro suplemento que puede o no agregársele a los medios de cultivo, son las vitaminas 107 de Diamond (Dulbecco, 1973), que consisten en: ácido p-aminobenzoico, niacinamida, hipocloruro de piridoxina, hipocloruro de piridoxal, hidrocloreuro de tiamina, pantotenato de calcio, l-inositol, cloruro de colina, riboflavina, biotina, ácido fólico, vitamina D2 (calciferol), vitamina K (menadiona bisulfito de sodio), vitamina B12, vitamina E (acetato de alfa tocoferol).y Tween 80 (cadenas alifáticas de 18-20 carbonos). Hasta la fecha, no existen reportes sobre la contribución de las vitaminas, en la expresión y producción de los factores involucrados en virulencia de este protozoario. (Mata-Cardenas B. D. y Said-Fernández S. 1990).

3. HIPOTESIS

La presencia de la mezcla vitamínica 107 de Diamond en el crecimiento de trofozoítos de *Trichomonas vaginalis* contribuye al aumento de la actividad hemolítica y fosfolipásica producida por la fracción vesicular P30, S30 y extracto total a pH 8.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo General

Comparar la actividad hemolítica y fosfolipásica A2 en las fracciones P30, S30 y Extracto Total a pH 8 de trofozoítos de *T. vaginalis* cultivados en presencia y ausencia de vitaminas.

4.2 Objetivos Específicos

- Cultivar en forma axénica la cepa GT-15 en medio PEHPS-1 adicionado con 9% de suero bovino y en presencia (PEHPS-CV) y ausencia (PEHPS-SV) de vitaminas 107 de Diamond.
- Elaborar curvas de crecimiento de *T. vaginalis* cepa GT-15 en presencia y en ausencia de vitaminas 107 de Diamond. Evaluar sus parámetros de crecimiento (tiempo de duplicación, tiempo de generación, intercepto en la curva, pendiente y r^2 – coeficiente de determinación) en el medio de cultivo PEHPS adicionado con suero.
- Obtener la fracción Extracto total, la fracción P30 y fracción S30 de la cepa GT-15 a pH 8 cultivada en PEHPS-CV y PEHPS-SV.

- Cuantificar y comparar la actividad hemolítica de las fracciones obtenidas en PEHPS-CV y PEHPS-SV, en cuanto al tiempo y la dosis para obtener la dosis hemolítica 50 (DH50).
- Cuantificar y comparar la actividad fosfolipásica tipo A2 de las fracciones P30, S30 y Extracto total en cuanto al tiempo y la dosis en PEHPS-CV y PEHPS-SV.
- Analizar estadísticamente los resultados.

5. MATERIAL Y MÉTODOS

5.1 Reactivos

Todos los compuestos utilizados para la realización de esta tesis fueron de grado reactivo y sus orígenes fueron los siguientes:

- Bioxón (Becton Dickinson de México S.A. de C.V.): Peptona de caseína, dextrosa.
- Control Técnico y Representaciones, S.A. de C.V. (Monterrey, N. L. México): Fosfato de potasio monobásico, dibásico, ácido acético glacial, cloroformo, cloruro de sodio.
- Merck México, S. A.: Placas de cromatografía capa fina.
- New England Nuclear (Boston Mass. EUA): substrato radiactivo [N-metil- ^{14}C]-fosfolipasa.
- Productos Químicos Monterrey, S. A.: Carbonato de sodio, ácido clorhídrico, cloruro de calcio, hidróxido de sodio, yodo resublimado, citrato de amonio-férrico, tartrato de sodio y potasio, sulfato de cobre pentahidratado, formaldehído, ácido tricloroacético, butanol.
- RELABY, S.A. de C.V. (México, D. F.): Metanol.
- Sigma Chemical Company (Saint Louis, Missouri, E.U.A): L-cisteína hidrociorada monohidratada, ácido ascórbico, fosfato de potasio monobásico, seroalbúmina bovina (fracción V), lauril sulfato de sodio, trizma-HCl, trizma-base, EDTA, ácido tricloroacético, butanol, formalina, las sales: MgCl_2 , MnCl_2 , CoCl_2 , CaCl_2 , HgCl_2 , y ZnSO_4 .
- (Sigma, MO, United States of America) Enzima pura de *Bacillus cereus*, E.C.3.1.4.12. (Esfingomielinasa C).
- Spectrum Quality Products, Inc.: Reactivo de Folin-Cicalteau.

5.2 Material Biológico

5.2.1 Cepa de *Trichomonas vaginalis* GT-15

Utilizamos la cepa GT-15 de *Trichomonas vaginalis* para desarrollar esta tesis por ser una de las cepas más virulentas y porque en ella se ha caracterizado la presencia de algunas actividades biológicas relevantes como hemólisis y actividad de fosfolipasas (Vargas *et al.*, 2003). Esta cepa fué donada a nuestro laboratorio por el Dr. Fernando Anaya Velásquez del Instituto de Investigaciones en Biología Experimental, Facultad de Química de la Universidad de Guanajuato. Gto. México, en 1995 y desde entonces ha estado crió-preservada bajo nitrógeno líquido y en resiembras continuas tres veces por semanas durante 14 años. Para este proyecto descongelamos la cepa original (para que conserve las características originales) y se ha mantenido en cultivo en PEPHS (Said *et al.*, 1988) en los medios PEHPS-CV y PEHPS-SV para hacer los experimentos correspondientes.

5.2.2 Suero bovino

El suero bovino se obtuvo de sangre bovina colectada del rastro municipal en la ciudad de Monterrey. La sangre se dejó coagular a 37 °C por 12 h, posteriormente se separó el coágulo del suero por centrifugación a 2,000 rpm durante 15 min. Después de este tiempo, el suero fue esterilizado usando papel Whatman No. 1 y un sistema de filtros diferentes (desde 10 mm a 0.22 micras de porosidad) (Corning, Inc, N.Y., E.U.A). El suero estéril se descomplementó por calentamiento a 56 °C durante 30 min (agitando cada 5 min). Se dejó enfriar a temperatura ambiente y se le adicionaron 25 mL de la mezcla vitamínica 107 de Diamond (JRH Biosciences, Lenexa, Ks) por cada litro de suero. Finalmente se distribuyó en alícuotas de 100 mL y se almacenó en frascos de 125 mL a -20 °C hasta su uso (Garber *et al.*, 1986; Said *et al.*, 1988).

5.3 Medios de Cultivo

5.3.1 Medio base PEHPS-CV o PEHPS-SV

TABLA I

Para la preparación del medio base se utilizaron los siguientes componentes:

Componentes	Cantidad (g/L)
Peptona de Caseína	10
Ácido Ascórbico	0.20
L-cisteína	1.00
Glucosa	6.00
Fosfato Monobásico de Potasio	0.6
Fosfato Dibásico de Potasio	1.0
Extracto de Hígado y Páncreas	250 MI

Las cantidades corresponden a la preparación de un Litro de medio de Cultivo

Para la preparación del medio base se utilizaron los componentes mostrados en la tabla I. Todos los componentes se disolvieron en 600 mL de agua desionizada. Ajustamos el pH a 7.0 con NaOH y se aforó a 1,000 mL con agua desionizada. Se colocaron 5.5 mL de medio en tubos de 13 X 100 para cultivo con tapón de rosca ó bien 600 mL en Spinners (borosilicato, Corning Co., Alemania) con capacidad de 1,000 mL. El medio se esterilizó en autoclave por 15 minutos a 121 °C con los tapones flojos, los que se apretaron después, estando los recipientes a temperatura ambiente y los almacenamos a -20 °C hasta su uso.

5.3.2 Medio Completo PEHPS-CV o PEHPS-SV

La descongelación de los tubos o Spinners con medio PEHPS-CV o PEHPS-SV se hizo en baño de agua a 37 °C. Se les añadió asépticamente 10.0% de suero bovino al medio basal antes de inocular los trofozoítos de *T. vaginalis*

5.4 Soluciones de Trabajo

Por comodidad se prepararon soluciones concentradas, indicadas con un número seguido de una X que representa su concentración respecto a la solución de trabajo (ó solución 1X).

5.4.1 PBS 10X

NaCl 6.5 g; K₂HPO₄ 2.8 g; KH₂PO₄ 0.5 g. Se disolvieron los componentes en 100 mL de agua bidestilada, y el pH se ajustó a 7.5 con NaOH 1 N. Se verificó con un osmómetro que la osmolaridad fuera de 290 mOsm/kg. Finalmente se dividió la solución en alícuotas de 10 ml en tubos de 13 x 150 mm para esterilizar los tubos en autoclave y se almacenaron a 4 °C hasta su uso.

5.4.2 SSB

5.4.2.1 SSB 10X

CaCl₂ 0.175 g; Glucosa 1.0 g; NaCl 7.2 g; KCl 0.4 g; MgSO₄ 0.2 g; Trizma-base 0.12 . Se mezclaron y disolvieron todos los componentes en agua bidestilada estéril y se ajustó el pH a 8.0 con NaOH 10 N. La solución se aforó a 100 mL y se distribuyó en alícuotas de 10 mL en tubos de 13 x 150

mm con tapón de rosca. Por último se esterilizaron por filtración y se almacenaron a -20 °C hasta su uso.

5.4.2.2 SSB 1X

La solución de trabajo se preparó diluyendo 10 ml de la solución 10X con 90 mL de agua bidestilada. Se verificó con un osmómetro que la osmolaridad fuera de 290 mOsm/Kg. Se esterilizó por filtración y se usó inmediatamente o se almacenó a -20 °C en alícuotas de 10 mL hasta su uso.

5.4.3 MgCl₂ 10 mM

MgCl₂ 50.8 mg. Se disolvió el componente en 25 mL de agua bidestilada y se almacenó en alícuotas de 1 mL a -20 °C hasta su uso.

5.4.4 EDTA 10 mM

EDTA (disódico) 93.05 mg. Se disolvió el componente en 25 mL de agua bidestilada y se almacenó en alícuotas de 1 mL a -20 °C hasta su uso.

5.4.5 Tritón X 100 al 4%

Tritón X 100 1 mL. Se mezcló un mililitro del Tritón X 100 con 24 mL de agua bidestilada y se almacenó en alícuotas de 2.5 mL en tubos de criopreservación a -20 °C hasta su uso.

5.4.6 Tris-HCl (10X)

Tris-HCl 3.9 g. Se disolvió el componente en 15 mL de agua bidestilada y se ajustó el pH a 8.0 con NaOH 10 N. Finalmente se aforó a 25 mL con agua bidestilada y se almacenó a -20 °C, dividida en alícuotas de 2.5 mL.

5.4.7 Solución Concentrada de Enzima Pura de *Bacillus cereus*

Fosfolipasa A2 0.76 mg. Se disolvió el componente en 1 mL de SSB a pH 8 y se almacenó en atmósfera de nitrógeno a -70 °C hasta su uso.

5.4.8 Diluciones de Enzima pura Total de *B. cereus*

Se mezclaron 10 µL de la solución concentrada de enzima pura con 90 µL de SSB. Se realizó el mismo procedimiento tres veces más hasta tener una dilución de 1×10^{-4} , la cual fue almacenada a -20 °C hasta su uso.

5.4.9 Mezcla de Ensayo para la actividad de fosfolipasa A2

TABLA II

Todos los componentes de la tabla II se depositaron en viales Bellco de policarbonato de 1 mL (Bellco, E.U.A.). Se aforaron a 1 mL con agua desionizada y se sonicó (Sonicador LAB-LINE INSTRUMENTS, INC. MELROSE PARK, ILL 60160) a 40 watts por 60 s. Se utilizó esta mezcla inmediatamente ó la almacenamos a -70 °C.

Componentes	Volumen (µL)	Concentración Final
TRIS-HCl(10X)	200	200mM
MgCl ₂ (10X)	200	2mM
Tritón X 100(10X)	200	0.8%
Fosfolipasa (1mg/mL)	2	2µg/mL
[N-Metil- ¹⁴ C]Fosfolipasa 10µCi/250µL	62.5	2.5µCi/mL
Agua desionizada	335.5	--

Los volúmenes corresponden a la preparación de 1 mL de la mezcla de ensayo 2X.

5.4.10 Mezcla para Detener la Reacción

Mezclamos el ácido tricloroacético en butanol al 5% más esfingomielina, colina y ceramida en concentración de 1 mg/mL.

5.4.11 Fase Móvil para Cromatografía en Placa Fina

La fase móvil se preparó a un volumen final de 23.5 mL y consistió en una mezcla de Cloroformo: metanol: agua (65:25:4 v/v).

5.4.12 Fase Móvil para Cromatografía en Placa Fina Bidireccional

Para la separación bidireccional de la cromatografía en placa fina usamos la fase móvil I, se preparó a un volumen final de 50 mL y consistió en una mezcla de Metanol:Agua (25:25 v/v) y la fase II, se preparó a un volumen final de 23.5 ml donde se mezcló Cloroformo: metanol: agua (65:25:4 v/v).

5.5 Tratamiento del Material para Cultivo

Los trofozoítos de *Trichomonas vaginalis* son muy sensibles a la presencia de detergentes y cloro en los materiales del cultivo, por ello se añadieron los siguientes pasos de lavado.

5.5.1 Lavado de Tubos de cultivo

El lavado de tubos para cultivo comprendió los siguientes pasos: 1) enjuague del material de vidrio con agua de la llave cuando menos tres veces, 2) enjuague de por lo menos 24 h en Cloro diluido al 1% en agua de la llave, 3) tallado con escobillón, 4) cuatro enjuagues con agua de la llave, 5) enjuague por 24 h en HCl al 1%, 6) seis enjuagues con agua de la llave, 7) tres enjuagues con agua destilada y 8) secado y esterilización de los tubos y botellas en horno a 200 °C por 3 h para finalmente dejarlos enfriar y almacenarlos en gavetas libres de polvo y cerradas.

5.5.2 Lavado de Pipetas Serológicas

Las pipetas serológicas (Bellco Glass Inc. N. Y. EUA) y las pipetas Pasteur se lavaron mediante: 1) remojo en PCC-54 (formula protegida con patente) al 1% (en pipeteros de polipropileno Nalgene Labware Division, N. Y. EUA) por 24 h, 2) enjuague en un sifón para lavar pipetas durante 2 h, 3) remojo en mezcla crómica por 5 min, 4) enjuague en un sifón por 1h y 5) enjuague en agua destilada.

Las pipetas se secaron en horno a 200 °C durante 60 min y se esterilizaron en contenedores de acero inoxidable o envuelto en papel aluminio en el horno a 200 °C por 3 h o en autoclave a 125 °C por 15 min. Los bulbos para las pipetas se colocaron en frascos de vidrio y se esterilizaron en autoclave a 125 °C por 15 min.

5.6 Tratamiento del Material para Cromatografía

5.6.1 Lavado y Secado

El lavado del material para cromatografía, lo que comprende a tanques para las cromatoplasmas, vasos y pipetas, comprendió los siguientes pasos: 1) dos enjuague con jabón comercial en polvo, 2) seis enjuagues con agua de la llave, 3) enjuague por 12 h con mezcla crómica, 4) siete enjuagues con agua de la llave, 5) tres enjuagues con agua destilada, 6) dos enjuagues con cloroformo:metanol (2:1), 7) secado en horno a 80 °C por 3 h. Se almacenó este material en gavetas cerradas y libres de lípidos.

5.7 Mantenimiento de la Cepa

Se conservó la cepa de referencia mediante subcultivos en medio PEHPS-CV y PEHPS-SV, además de los cultivos masivos de tricomonas en suspensión (Vargas 2005). Para este proyecto llevamos dos grupos de referencia de la cepa GT-15. El primero consistió en añadir al medio PEHPS 250 µl de vitaminas 107 de Diamond por cada 10 ml de medio y a este grupo lo llamamos PEPHS-CV; y al segundo grupo le añadimos 250 µl de SSB al cual llamamos PEHPS-SV.

Los cultivos masivos los obtendremos en spinners de 1,000 ml de capacidad conteniendo 600 ml de medio PEHPS suplementado con 10% de suero en presencia y ausencia de vitaminas 107 de Diamond, inoculando 5×10^3 trofozoítos/mL.

5.7.1 Obtención de los extractos celulares

5.7.1.1 Obtención del Extracto Total (ET)

Para obtener el extracto total (ET), se obtuvieron los trofozoítos provenientes de cada medio de cultivo en presencia y ausencia de vitaminas y se lavaron con dos volúmenes de solución salina amortiguada (SSB) agitando suavemente con pipeta Pasteur y se homogeneizó con 40 golpes de Elvehjem-Potter de borosilicato con émbolo de teflón (Bellco, Glass Inc. N. Y. EUA) activado con un motor eléctrico a 1000 rpm.

5.7.1.2 Obtención del Extracto P30 Y S30

Después de este tratamiento se centrifugó el ET a 30,000 x g por 30 minutos exactos. Se separó el sobrenadante que correspondió a la fracción S30 y el

sedimento que correspondió a la fracción P30 la resuspendimos con un volumen de SSB.

Ambas fracciones se guardaron a -70°C hasta su uso. Durante todo el proceso de obtención de extractos las muestras se manipularon a 4°C . (Vargas, 2005)

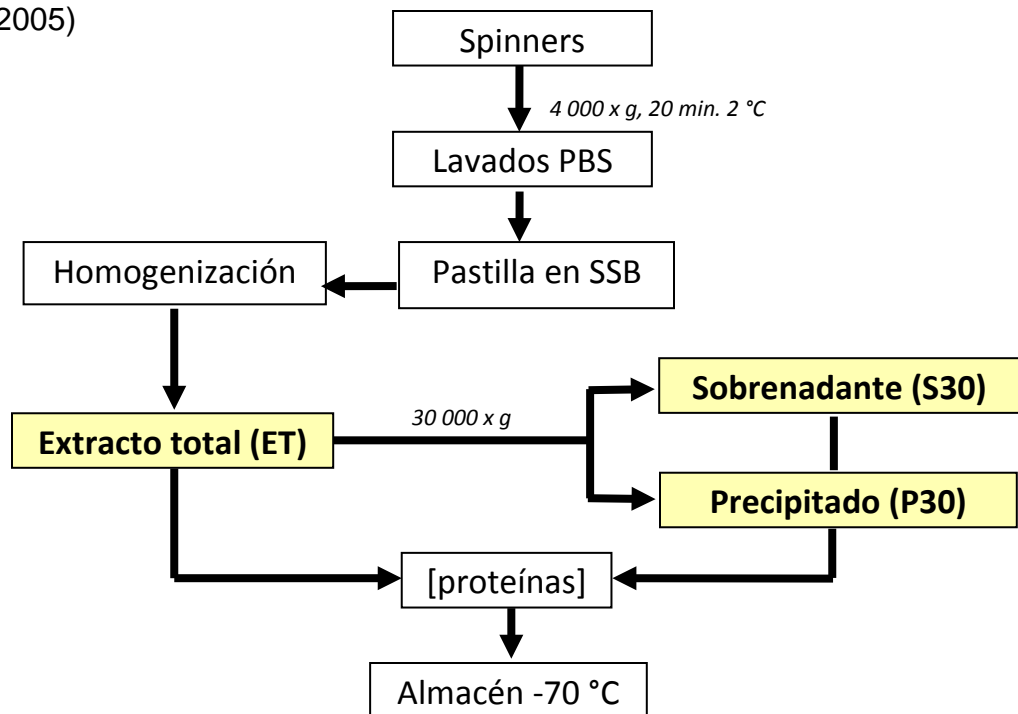


Diagrama de obtención de Extracto Total (ET) sobrenadante (S30), Precipitado (P30)

5.8. Obtención de eritrocitos de rata

Se aplicó anestesia a la rata, vía intraperitoneal con una solución de 0.063 g/ml de pentobarbital sódico de uso veterinario (Smithkline Norden, México), con jeringa de 1 ml y aguja calibre No. 25 a una dosis de 3 a 5 mg/100g de peso corporal. Se rasuró el vientre y se desinfectó el área con una solución acuosa de cloruro de benzalconio al 0.25%. Después con tijeras realizamos laparotomía exploratoria exteriorizando los órganos internos para visualizar la vena aorta descendente.

Se colectó la sangre y se diluyó con un volumen igual de Alsever, mediante punción aórtica con aguja calibre 20. Inmediatamente después del sangrado, se lavó la sangre 2 veces para obtener a los eritrocitos con PBS y el tercero con SSB. Después de cada lavado se eliminó por aspiración el sobrenadante líquido y el sedimento blanco (leucocitos) depositados sobre la pastilla de eritrocitos. Fraccionamos los paquetes celulares en alícuotas de 1 mL y se almacenaron a 4 ° C por una semana (Lozano, 2000).

5.9. Cuantificación de la actividad hemolítica

Determinamos la actividad hemolítica mediante la liberación porcentual de hemoglobina. En tubos de polipropileno (Eppendorf de 1.5 mL) con 25 µl de eritrocitos de rata al 2%, ajustamos los volúmenes de las mezclas de ensayo a 50 µl con SSB (control negativo), fracción P30 obtenida en medio PEHPS-CV o PEHPS-SV y se incubaron a 37 °C en un baño de agua por tiempos variables. Al cabo de los cuales, se añadió 1 ml de PBS, centrifugamos los tubos por 9 min. a 600 X g, en una centrífuga (Beckman de 12 plazas) y se midió la absorbancia de los sobrenadantes a 415 nm. La determinación de la actividad hemolítica de la fracción P30 (fracción con mayor actividad hemolítica 84%) se obtuvo, mediante la liberación porcentual de hemoglobina. La absorbancia de los lisados de eritrocitos de rata es máxima a 415 nm. Calculamos la liberación porcentual de hemoglobina de la fracción subcelular P30 (150 µg de proteína total). Se dividió el promedio de las absorbancias contra la liberación de hemoglobina (obtenida por choque hipotónico con agua destilada –control positivo-), multiplicada por 100. Graficamos el porcentaje de hemoglobina liberada contra la concentración de las P30 obtenidas PEHPS-CV y PEHPS-SV y obtuvimos curvas sigmoides en cuyas regiones lineales determinamos por interpolación la dosis hemolítica media (DH₅₀).

5.10 Método Para Determinar La Actividad Fosfolipásica

Determinamos la actividad fosfolipásica del tipo A2, basándonos en el método descrito por Vargas-Villarreal y col. (Vargas-Villarreal, J. *et al.* 1995), que consistió en: determinar los productos de hidrólisis (ácidos grasos liberados (AGL) y lisofosfatidilcolina (LFC)) del 2-palmitoil-[2-palmitoil- ^{14}C]fosfatidilcolina (^{14}C FC). Este sustrato está marcado en el carbono 1 del ácido palmítico esterificado en la posición 2 del glicerol, considerando que si la radioactividad se localizaba en las manchas cromatográficas correspondientes a ^{14}C LFC, pero no en las de ^{14}C AGL, la enzima sería del tipo A1. En el caso contrario estas corresponderían a una fosfolipasa del tipo A2. Los lípidos marcados fueron diluidos con fosfatidilcolina (FC) de yema de huevo a una concentración específica de 1800 $\mu\text{Ci}/\text{mole}$ y solubilizadas en presencia de 0.4 % de Tritón X 100. Estas mezclas fueron diluidas 1:1 con la fracción P30. El ensayo final (0.02 mL) contiene: 100 mM de Tris-HCL, pH 8.0, 0.138 mM de FC, 0.2% de Tritón X 100, 1 mM de calcio y la muestra. Después de tiempos variables de incubación o concentraciones diferentes de proteínas, la reacción fue parada con 25 μl de una mezcla de FC (0.75 mg/mL), AGL (1 mg/mL), LFC (1 mg/mL) en TCA-butanol (5 %), agitamos los tubos en un vórtex. Determinamos la radioactividad presente en las manchas correspondientes a FC, LFC y AGL, separadas mediante cromatografía en placa fina (Vargas-Villarreal, *et al.* 1995). Aplicamos 25 μl en placas cromatográficas de sílica gel; separamos los lípidos utilizando un disolvente para lípidos no polares como son el cloroformo:metanol:ácido acético:agua (170:40:16:8). Después colocamos las placas en una cámara saturada con vapores de yodo, con lo cual las manchas lipídicas se revelaron como puntos amarillos o cafés sobre el fondo blanco (Skipsky, J. P. y Barclay, M. 1969). Finalmente mezclamos cada mancha lipídica con 5 mL de mezcla para centelleo líquido (2-5 difeniloxazole PPO, 6% en tolueno) en viales de borosilicato de 20 mL de capacidad.

Hicimos la cuantificación en un espectrofotómetro de centelleo líquido (Beckman Instrument, modelo Tri-Carb 1600 TR Packard A camberra Company. (Vargas-Villarreal, J. *et al.* 1995)

5.11 Cuantificación De Proteínas

Determinamos la concentración de proteínas en la fracción P30 amibianas (muestras particuladas) mediante el método de Lowry(Lowry, *et al.* 1951).

6. RESULTADOS

6.1. CINETICA DE CRECIMIENTO DE LA CEPA GT-15 CULTIVADA EN PRESENCIA Y AUSENCIA DE VITAMINAS 107 DE DIAMOND

Desde hace muchos años se han utilizado las vitaminas 107 de Diamond como un suplemento nutricional en los cultivos de *T. vaginalis*. Todos los trabajos anteriores se han basado en discernir si estos componentes son esenciales para el crecimiento de los trofozoitos de *T. vaginalis* en presencia de las vitaminas. Hasta la fecha no se han encontrado datos que sustenten que los trofozoitos requieran estos factores para su crecimiento, pero esta hipótesis no se ha aplicado a factores de virulencia de los trofozoitos, como se basó esta tesis. Por lo anterior, decidimos explorar con mayor profundidad el efecto de las vitaminas 107 de Diamond y su participación en algunos parámetros que son considerados como factores de virulencia.

Como paso inicial, determinamos algunos factores de crecimiento de la cepa GT-15, cultivadas en el medio PEPHS, en presencia (PEHPS-CV) y ausencia (PEHPS-SV) de vitaminas 107 de Diamond. La (Fig.4) corresponde a una curva típica de crecimiento de la cepa GT-15 en medio PEPHS-CV y en medio PEPHS-SV. A partir de cada ecuación determinamos un tiempo de duplicación de 3.75 h, un tiempo de generación de 5.2 h en el medio PEPHS-CV. En trofozoitos cultivados en el medio PEPHS-SV encontramos un tiempo de duplicación de 3.75 h, un tiempo de generación de 5.3 h. Con estos resultados observamos que no hay diferencia estadísticamente significativa entre la presencia y ausencia de vitaminas 107 de Diamond en el crecimiento de trofozoitos de *T. vaginalis*. Estos parámetros de crecimiento sirvieron además para definir tanto el inóculo

como los días de cultivo necesarios para obtener cultivos creciendo en la fase exponencial y en buenas condiciones fisiológicas.

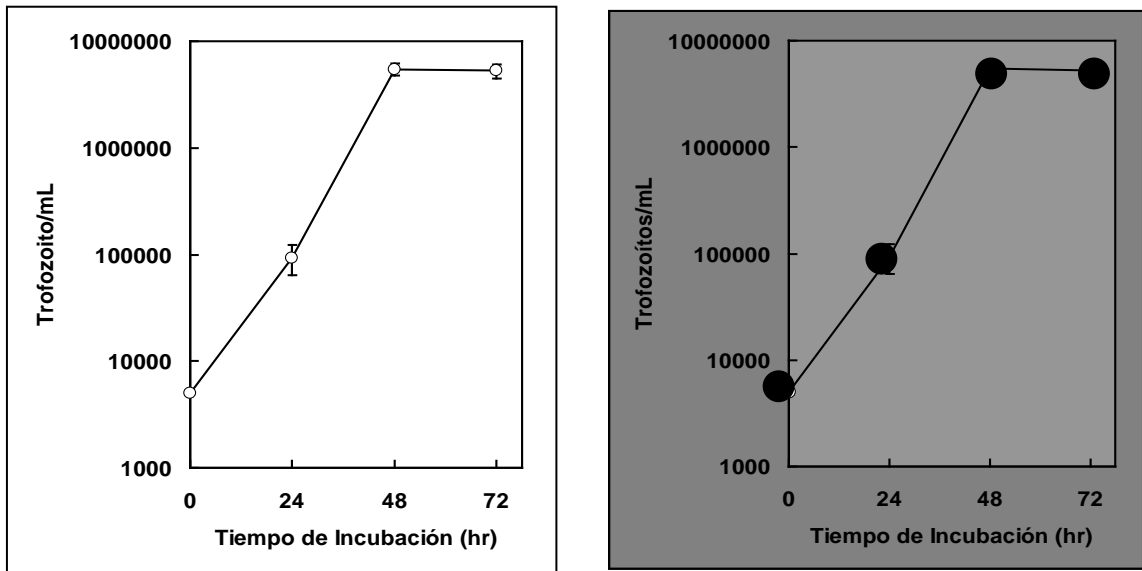


Figura 4. Relación temporal del crecimiento de la cepa GT-15 en medio PEHPS-CV y PEHPS-SV.

Inoculamos por triplicado 5×10^3 trofozoítos/mL en tubos con 5.6 ml de medio PEHPS, 1 ml de suero bovino y 250 μ l de vitaminas 107 de Diamond PEHPS-SV (O) o 250 μ l de SSB PEHPS-CV (●). Después de diferentes tiempos de incubación a 37 °C determinamos la densidad de los cultivos con un hemacitómetro. Cada punto corresponde a cuatro determinaciones en dos experimentos independientes.

CARACTERIZACION DE LA ACTIVIDAD FOSFOLIPASICA A2 DE LA FRACCIÓN P30, S30 y ET OBTENIDA DE TROFOZOITOS DE *T. vaginalis* CULTIVADAS EN MEDIO PEHPS-CV Y PEHPS-SV

Después de los resultados obtenidos en la hemólisis, nuestro siguiente paso fue determinar y cuantificar la presencia de actividad de fosfolipasa del tipo A2 en las fracciones P30, S30 y ET obtenidas en PEHPS-CV y PEHPS-SV: Esta actividad es considerada como otro parámetro para medir la virulencia de *T. vaginalis*. Por ello nos propusimos cuantificar la actividad de fosfolipasa A2 en las P30, S30 y ET. Al incubar a 37 °C. por tiempos variables con 150 µg. de proteína total de P30, S30 y ET de PEHPS-SV (○) y PEHPS-CV (●), encontramos que la liberación de [¹⁴C]AGL (correspondiente a la actividad fosfolipásica de tipo A2) en trofozoitos de P30, S30 y ET se incrementó linealmente en función del tiempo de incubación (Fig. 5). También observamos que la radioactividad obtenida en las manchas cromatográficas de la P30, S30 y ET de los trofozoitos cultivados en el medio PEHPS-CV fue mayor que la P30, S30 y ET obtenida en PEHPS-SV.

CARACTERIZACION DE LA ACTIVIDAD FOSFOLIPASICA A2 DE LA FRACCION P30, OBTENIDA DE TROFOZOITOS DE *T. vaginalis* CULTIVADAS EN MEDIO PEHPS-CV Y PEHPS-SV

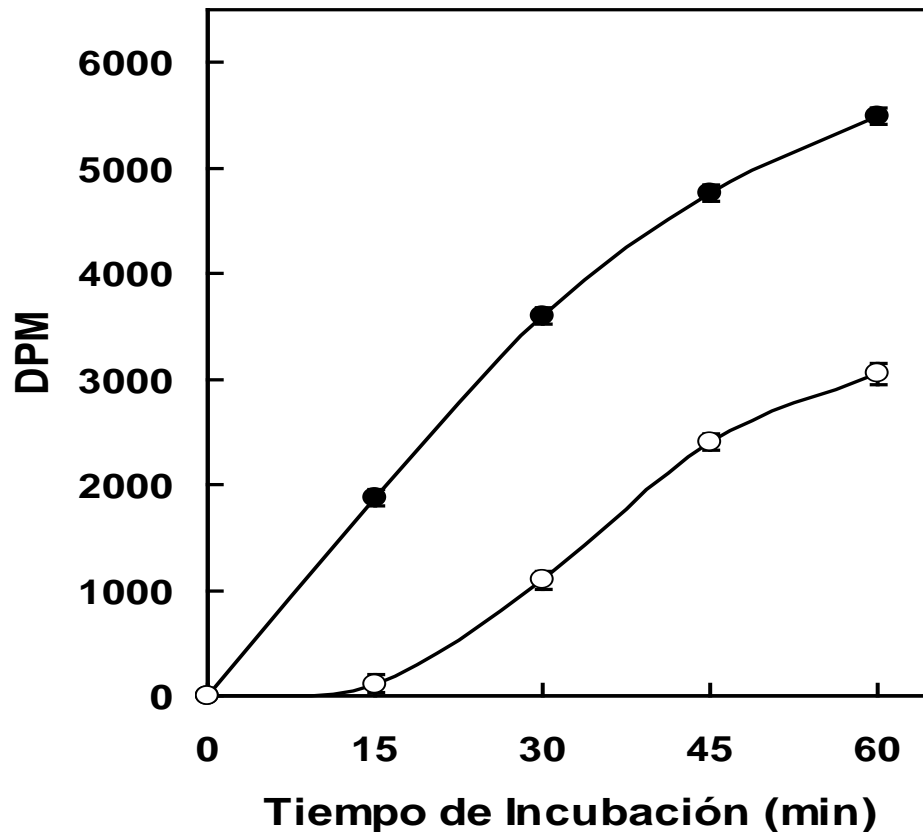


Figura 5.- Relación temporal de la actividad fosfolipásica de P30 obtenida de los medios PEHPS-CV y PEHPS-SV.

A tiempos variables de incubación a 37 °C. determinamos la actividad fosfolipásica de P30 obtenida de trofozoitos en los medios PEHPS-SV (O) y PEHPS-CV (●). Cuando en las mezclas de ensayo usamos como sustrato 4 μ Ci de [14 C]FC(2) y 150 μ g. de proteína total de P30, suspendidas en SSB pH 8. Después de la incubación separamos los productos de hidrólisis mediante cromatografía en placa fina y las cuantificamos en un contador de centelleo líquido. Los símbolos corresponden a [14 C]AGL. Los puntos corresponden al promedio y desviación estándar en 3 experimentos independientes.

Una vez que conocimos la dependencia del tiempo en la actividad fosfolipásica de la P30 obtenida en ambos medios PEHPS-CV y PEHPS-SV; nos propusimos cuantificar estas actividades de las P30 con respecto a la dosis. Donde encontramos que la P30 se incrementaron linealmente con respecto a diferentes concentraciones de proteína entre 0 y 100 µg. de proteína total, sin ninguna diferencia estadísticamente significativas entre trofozoitos P30, pero con 150 µg. de proteínas observamos que la P30 proveniente de PEHPS-CV fue 2 veces mayor su actividad que la P30 obtenida del medio PEHPS-SV (Fig. 6).

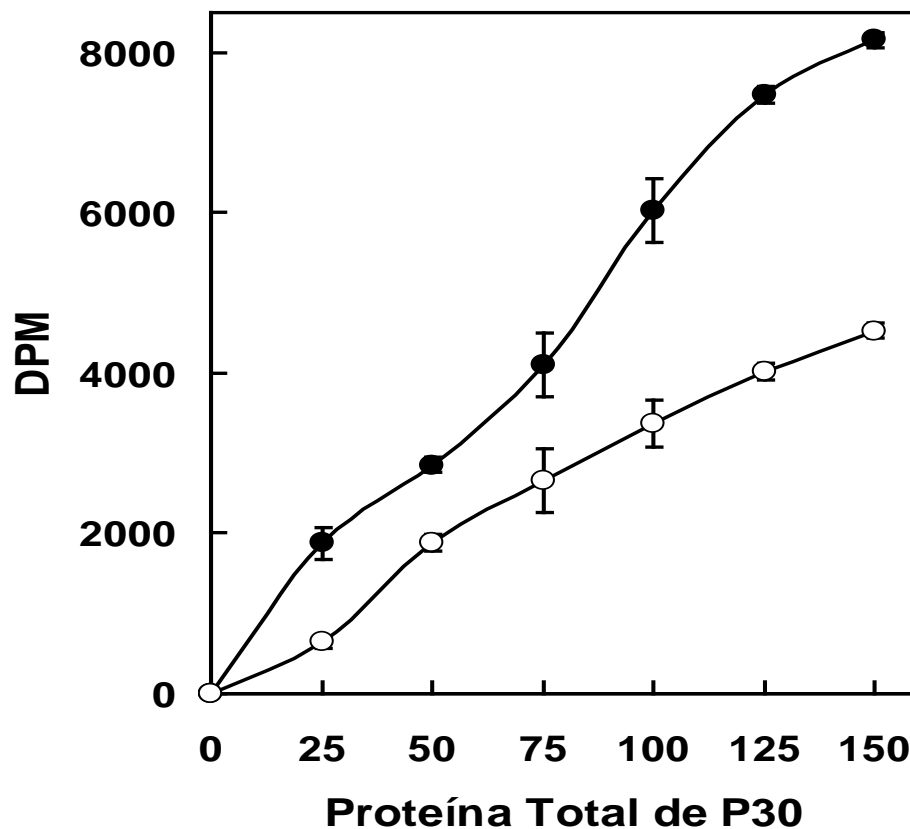


Figura 6.- Relación entre la cantidad de proteína total de P30 obtenida de los medios PEHPS-CV y PEHSSV y la liberación del $[^{14}\text{C}]\text{AGL}$. Determinamos la actividad de fosfolipasa usando una mezcla de ensayo con 4 µCi de $[^{14}\text{C}]$ FC(2) y concentraciones variables de proteínas de P30 obtenidas de los medios PEHPS-SV (O) y PEHPS-CV (●). Después de 150 min. de incubación a 37 °C. determinamos la radioactividad correspondiente a la mancha lipídica de $[^{14}\text{C}]\text{AGL}$ después de separar los productos de hidrólisis mediante cromatografía en placa fina. Los símbolos corresponden al promedio y desviación estándar en 3 experimentos independientes.

CARACTERIZACION DE LA ACTIVIDAD FOSFOLIPASICA A2 DE LA FRACCION S30 OBTENIDA DE TROFOZOITOS DE *T. vaginalis* CULTIVADAS EN MEDIO PEHPS-CV Y PEHPS-SV

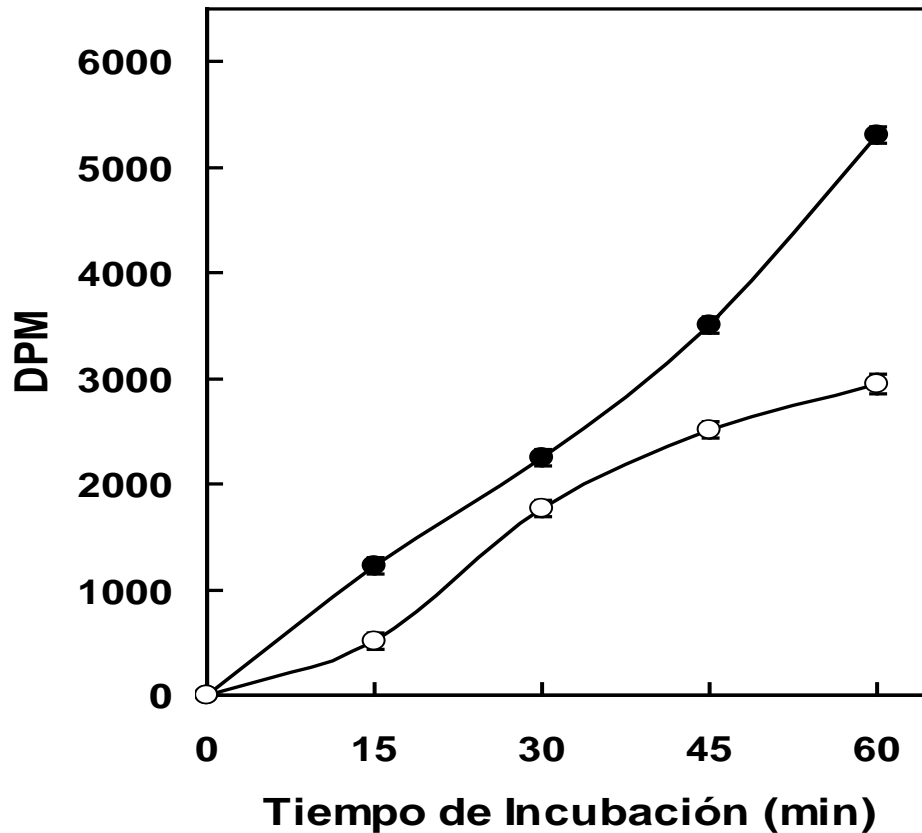


Figura 7.- Relación temporal de la actividad fosfolipásica de S30 obtenida de los medios PEHPS-CV y PEHPS-SV.

A tiempos variables de incubación a 37 °C. determinamos la actividad fosfolipásica de S30 obtenida de trofozoitos en los medios PEHPS-SV (O) y PEHPS-CV (●). Cuando en las mezclas de ensayo usamos como sustrato 4 μ Ci de [14 C]FC(2) y 150 μ g. de proteína total de S30, suspendidas en SSB pH 8. Después de la incubación separamos los productos de hidrólisis mediante cromatografía en placa fina y las cuantificamos en un contador de centelleo líquido. Los símbolos corresponden a [14 C]AGL. Los puntos corresponden al promedio y desviación estándar en 3 experimentos independientes.

Una vez que conocimos la dependencia del tiempo en la actividad fosfolipásica de la S30 obtenida en ambos medios PEHPS-CV y PEHPS-SV; nos propusimos cuantificar estas actividades de las S30 con respecto a la

dosis. Donde encontramos que la S30 se incrementaron linealmente con respecto a diferentes concentraciones de proteína entre 0 y 100 $\mu\text{g.}$ de proteína total, sin ninguna diferencia estadísticamente significativas entre trofozoitos S30, pero con 150 $\mu\text{g.}$ de proteínas observamos que la S30 proveniente de PEHPS-CV fue 8 veces mayor su actividad que la S30 obtenida del medio PEHPS-SV (Fig. 8).

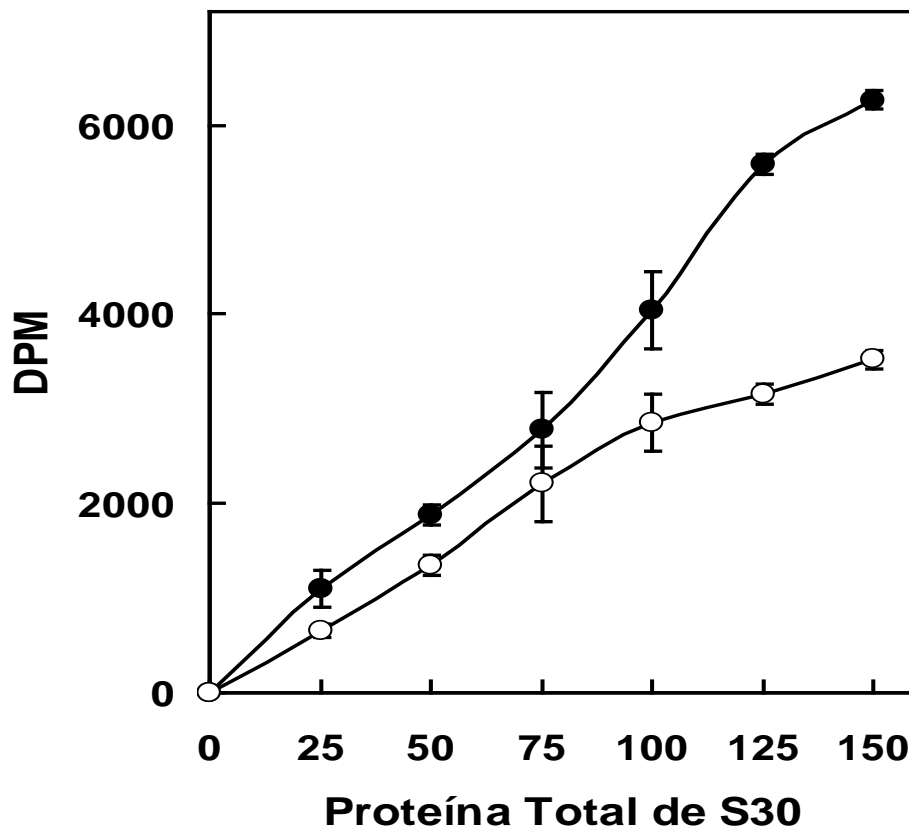


Figura 8.- Relación entre la cantidad de proteína total de S30 obtenida de los medios PEHPS-CV y PEHSSV y la liberación del $[^{14}\text{C}]\text{AGL}$. Determinamos la actividad de fosfolipasa usando una mezcla de ensayo con 4 μCi de $[^{14}\text{C}] \text{FC}(2)$ y concentraciones variables de proteínas de S30 obtenidas de los medios PEHPS-SV (O) y PEHPS-CV (●). Después de 150 min. de incubación a 37 °C. determinamos la radioactividad correspondiente a la mancha lipídica de $[^{14}\text{C}]\text{AGL}$ después de separar los productos de hidrólisis mediante cromatografía en placa fina. Los símbolos corresponden al promedio y desviación estándar en 3 experimentos independientes.

A tiempos variables de incubación a 37 °C. determinamos la actividad fosfolipásica de ET obtenida de trofozoítos en los medios PEHPS-SV y PEHPS-CV. Cuando en las mezclas de ensayo usamos como sustrato 4 μCi de $[^{14}\text{C}]\text{FC}(2)$ y 150 μg . de proteína total de ET, suspendidas en SSB pH 8. Después de la incubación separamos los productos de hidrólisis mediante cromatografía en placa fina y las cuantificamos en un contador de centelleo líquido. Los símbolos corresponden a $[^{14}\text{C}]\text{AGL}$. Los puntos corresponden al promedio y desviación estándar en 3 experimentos independientes.

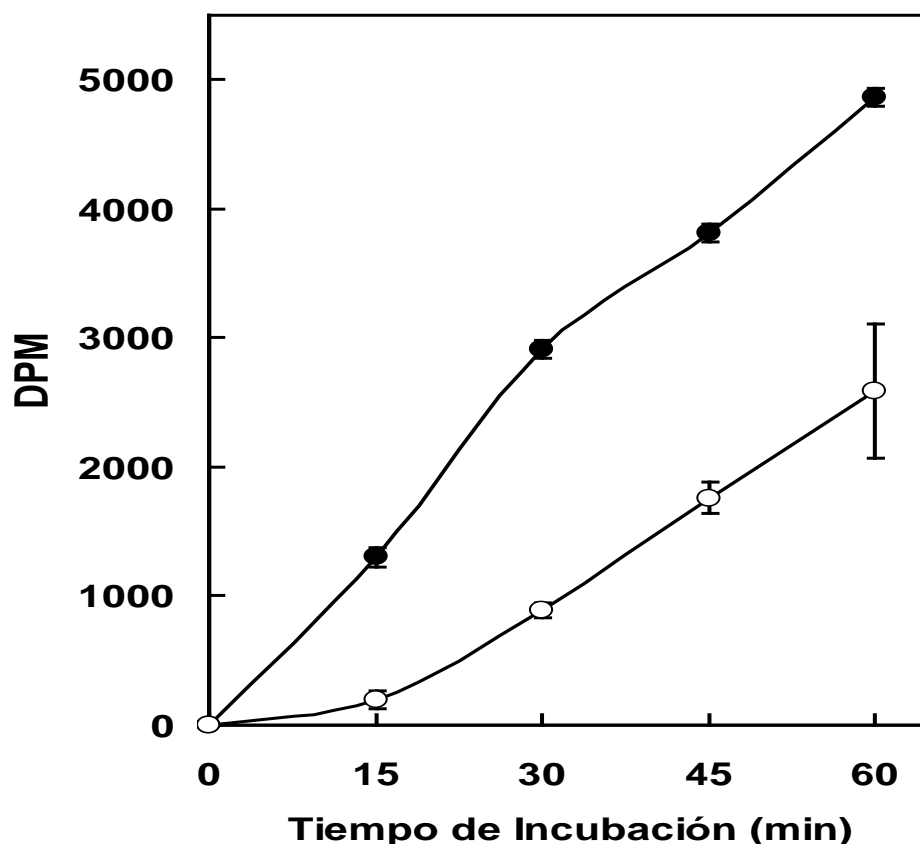


Figura 9.- Relación temporal de la actividad fosfolipásica de ET obtenida de los medios PEHPS-CV(●) y PEHPS-SV(O). A tiempos variables de incubación a 37 °C. determinamos la actividad fosfolipásica de ET obtenida de trofozoítos en los medios PEHPS-SV y PEHPS-CV. Los puntos corresponden al promedio y desviación estándar en 3 experimentos independientes.

Una vez que conocimos la dependencia del tiempo en la actividad fosfolipásica de ET obtenida en ambos medios PEHPS-CV y PEHPS-SV;

nos propusimos cuantificar estas actividades del ET con respecto a la dosis. Donde encontramos que la ET se incrementaron linealmente con respecto a diferentes concentraciones de proteína entre 0 y 100 µg. de proteína total, sin ninguna diferencia estadísticamente significativas entre trofozoitos ET, pero con 150 µg. de proteínas observamos que el ET proveniente de PEHPS-CV fue de 2.2 veces mayor su actividad que el ET obtenido del medio PEHPS-SV (Fig. 10).

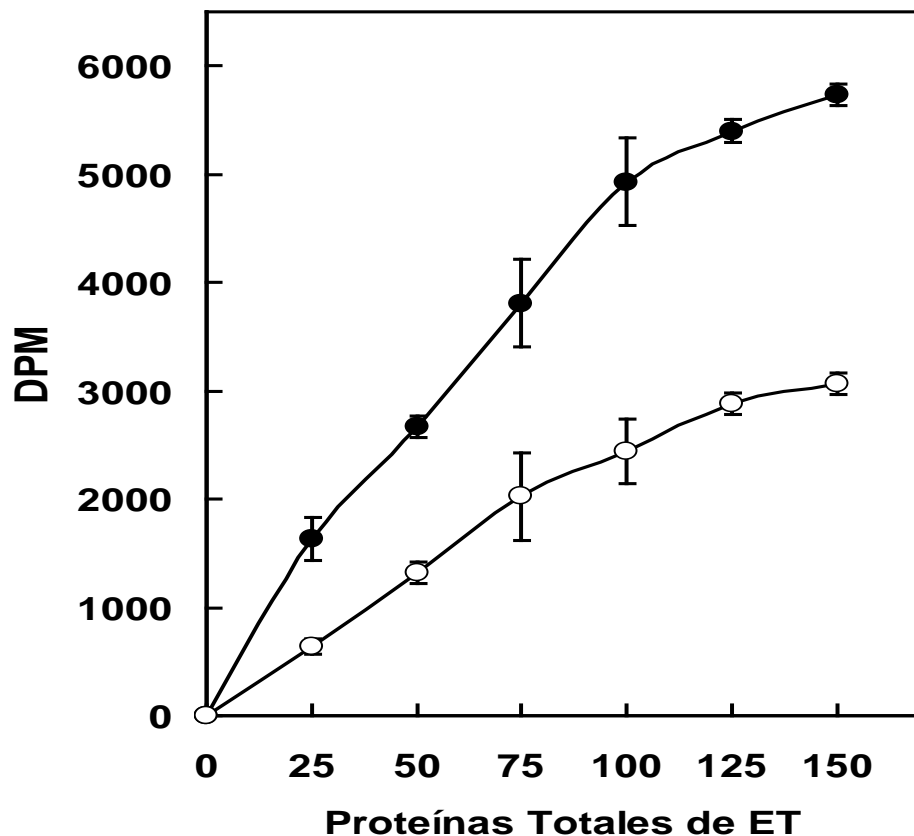


Figura 10.- Relación entre la cantidad de ET obtenida de los medios PEHPS-CV y PEHPS-SV y la liberación del [14 C]AGL. Determinamos la actividad de fosfolipasa usando una mezcla de ensayo con 4 µCi de [14 C] FC(2) y concentraciones variables de ET obtenidas de los medios PEHPS-SV (○) y PEHPS-CV (●). Después de 150 min. de incubación a 37 °C. determinamos la radioactividad correspondiente a la mancha lipídica de [14 C]AGL después de separar los productos de hidrólisis mediante cromatografía en placa fina. Los símbolos corresponden al promedio y desviación estándar en 3 experimentos independientes.

7. DISCUSIÓN

La virulencia de los microorganismos, incluyendo la de los protozoarios es un fenómeno muy complejo que depende de dos propiedades generales: invasividad y la toxigenicidad (Davis, B. D. *et al.* 1973). La virulencia de *T. vaginalis* (cuyos mecanismos patogénicos se desconocen en gran parte), parece depender fundamentalmente de su invasividad ya que sus efectos destructivos se llevan a cabo por su gran capacidad para proliferar y destruir los tejidos del huésped (Davis, B. D. *et al.* 1973; Ravdin, J. I y Guerrant, R. L. 1982).

En nuestro grupo estamos interesados en estudiar los posibles factores involucrados en la citólisis por contacto de estos parásitos, sobre las células blanco. Desde hace algunos años se ha propuesto que la presencia de actividades biológicas asociadas a membrana o liberadas al medio de cultivo, podrían estar involucradas en los mecanismos líticos usados por este parásito, tales son: lectinas, colagenasa, proteínas formadoras de poros, tiol-proteasas, hemolisinas y citolisinas (Mata-Cárdenas B. D. 1998; Ravdin, J. I y Guerrant, R. L. 1982; Roa, V. G. y Padma, M. C. 1971; Ravdin, J. I. y Guerrant R. L. 1982; Vargas-Villarreal, J y Saíd-Fernández S. 1984; Saíd-Fernández S., y López-Revilla, R. 1982; Saíd-Fernández S. y López-Revilla, R. 1986; Saíd-Fernández S, *et al.* 1986). En estos últimos dos mecanismos líticos se han propuesto que una o varias fosfolipasas del tipo A_2 están relacionadas con estas actividades patogénicas de *T. vaginalis* y que esta(s) podría(n) ser un posible factor de virulencia de este parásito (Vargas-Villarreal, J. *et al.* 1995; Saíd-Fernández S, *et al.* 1986).

Para el cultivo axénico *in vitro* de los trofozoítos de *T. vaginalis* se utiliza preferentemente el medio llamado PEHPS y está compuesto principalmente de extracto de hígado de res y páncreas de res y puerco (Saíd-Fernández, S., *et al.* 1988). En estos medios se requiere la presencia de un 9% de suero bovino o equino para que las amibas puedan crecer vigorosamente, sin este componente los trofozoítos se mueren a los tres días de cultivo. Obtuvimos las fracciones P30, S30 y ET de los extractos totales de los trofozoítos crecidos en presencia y ausencia de vitaminas 107 de Diamond, mediante homogeneización mecánica para preservar, en lo posible, la compartimentalización subcelular (Fig 3); otros investigadores rutinariamente homogeneizan los trofozoítos mediante sonicación o ciclos repetidos de congelación-descongelación, con lo que posiblemente se desnaturalizan algunas enzimas. Evitamos el uso de suero, de medios indefinidos o de cualquier componente en las mezclas de ensayo para determinar actividad hemolítica y fosfolipásica que pudieran interferir en estas actividades líticas producidas por la fracciones P30, S30 y ET.

Elegimos a la cepa GT-15 de *T. vaginalis* para desarrollar este trabajo por ser una de las cepas que produce mayor daño a las células y porque ella ha sido una cepa de referencia, además porque esta cepa es la más virulenta que se tiene en los laboratorios. Seleccionamos como células blanco a los eritrocitos de rata de la cepa *Sprague Dawley* por ser células susceptibles al efecto lítico de las fracciones amibianas y porque su composición y estructura de sus membranas son bien conocidas (Saíd-Fernández S., y López-Revilla, R. 1982) además estas células son muy abundantes y fáciles de obtener y manipular. Por otro lado, las vitaminas 107 de Diamond (Diamond L. S. *et al.* 1978), son un suplemento que puede o no agregarse a los medios de cultivo tradicionales. Los trabajos de investigación que se han reportado sobre el uso en los medios de cultivos de trofozoítos en presencia

de las vitaminas 107 de Diamond, han sido dirigidos sobre el crecimiento de *T. vaginalis*, en donde se han encontrado que no hay diferencia estadísticamente significativa en los rendimientos de los trofozoitos cultivadas en estas condiciones. Hasta la fecha, no existen reportes sobre la contribución de las vitaminas, en la expresión y producción de los factores putativos involucrados en virulencia de de trofozoitos de *T. vaginalis* que podrían resultar más virulentas.

De acuerdo con lo anterior, decidimos explorar el crecimiento de *T. vaginalis* en presencia (PEHPS-CV) y ausencia (PEHPS-SV) de las vitaminas 107 de Diamond en el medio PEHPS, donde hasta la fecha no se había probado si las vitaminas podían proporcionar una diferencia en la densidad de los trofozoitos. Cuando utilizamos esta estrategia encontramos lo que sucede en otros medios de cultivos; que no existe una diferencia estadísticamente significativa entre las dos pendientes. Con estos resultados pudimos confirmar lo esperado, que la presencia de vitaminas 107 de Diamond no se refleja en la densidad de los trofozoitos cultivadas *in vitro*; lo cual concuerda con lo que ya ha sido reportado por otros investigadores en otros medios de cultivo (Martínez-Palomo, A. 1982; Mata-Cárdenas B. D. 1998; Mata-Cárdenas B. D. y Said-Fernández S. 1990) ya que los tiempos de duplicación y de generación correspondieron para los trofozoitos cultivados en PEHPS-CV y PEHPS-SV a 3.75 h y 3.70h. y 5.2 y 5.3 h respectivamente, no resultando una diferencia significativa entre ambos tratamientos. En vista de los resultados anteriores decidimos analizar la participación de la actividad hemolítica de la fracción P30, S30 y ET obtenida de trofozoitos crecidos en PEHPS-CV y PEHPS-SV. Con respecto al tiempo de incubación encontramos que las actividades en ambos tratamientos no presentaron un período Lag, es decir ambas actividades comienzan a liberar hemoglobina por el daño a los eritrocitos a los primeros minutos de incubación; esto

posiblemente sea debido a la gran susceptibilidad de los eritrocitos empleados en nuestros ensayos. Observamos que la P30 proveniente de PEHPS-CV fue mayor que la P30 de PEHPS-SV. Una relación similar la encontramos en las curvas dosis-respuesta con ambos tratamientos la P30 obtenida en PEHPS-CV fue más activa que la P30 de PEHPS-SV.

Los datos anteriores demuestran que la presencia de vitaminas 107 de Diamond incrementa la actividad hemolítica producida por la fracción subcelular P30, lo cual nos sugiere que uno o varios componentes de esta mezcla vitamínica puede estimular: **a)** la producción de más proteína lítica, **b)** favorecer una mayor concentración de un cofactor o **c)** seleccionando una subpoblación de trofozoitos que resulte con más virulencia. Enseguida comprobamos que la P30 obtenida con ambos tratamientos (PEHPS-CV y PEHPS-SV), al igual que en la actividad hemolítica antes descrita, podía incrementar la actividad de fosfolipasa A2 presente en esta misma fracción. Ya que esta actividad se ha sugerido que pudiera estar involucrada como un factor de virulencia en los trofozoitos de *T. vaginalis*. Probamos esta hipótesis y encontramos que las fracciones P30 en ambos tratamientos, presentan actividad de fosfolipasas del tipo A2 cuantificable y reproducible, lo cual es dependiente tanto del tiempo de incubación como de la dosis (Fig. 7 y 8). En relación con el tiempo de incubación, encontramos que, la P30 obtenida en ambos tratamientos no presenta una fase Lag, lo cual indica que la actividad de la fosfolipasa A2 comienza a hidrolizar tan pronto como la enzima entra en contacto con el sustrato y la actividad de fosfolipasa parece ser de acción directa, es decir no requiere de la presencia de factores líticos directos como ácidos grasos libres y lisoderivados, para llevar a cabo su actividad (Fig. 7). Con respecto a la dosis la actividad de fosfolipasa del tipo A2, encontramos un incremento en la producción de los ácidos grasos libres entre 0 y 150 µg de P30 en ambos tratamientos (Fig. 8).

Hasta ahora se han propuesto aisladamente varias moléculas citolíticas para los trofozoítos de *T. vaginalis* que se han identificado, y aún purificado algunos factores que podrían actuar como tales para producir las lesiones. Es muy probable que todas ellas, y aún más, participen en la destrucción tisular y por lo tanto la propiedad citolítica de *T. vaginalis* sea un mecanismo multifactorial en el que es posible que algún factor o factores presentes en las vitaminas 107 de Diamond pudieran estar implicados en la producción de algún factor de virulencia, o que esté involucrado como cofactores enzimáticos o bien seleccionando una subpoblación de trofozoítos que sea más virulenta. El conocimiento más profundo de esta participación de las vitaminas 107 de Diamond permitirá determinar la contribución específica de esta en los mecanismos citolíticos de *T. vaginalis*.

8. CONCLUSIONES

- Confirmamos que en el medio PEHPS los trofozoitos de la cepa GT-15 cultivadas en presencia de las vitaminas 107 de Diamond, no presentaron un incremento estadísticamente significativo con respecto a Los trofozoitos cultivados en ausencia de estas vitaminas; ya que su tiempo de generación, tiempo de duplicación y velocidades de crecimiento fueron similares.
- Encontramos que la P30, S30 y ET obtenida de trofozoitos cultivados en PEHPS-CV incrementaron varias veces la actividad hemolítica 50 (HD_{50}) con respecto a la P30, S30 y ET obtenida en medio PEHPS-SV.
- También obtuvimos un incremento en la actividad fosfolipásica del tipo A2 de P30, S30 y ET obtenida de trofozoitos cultivados en PEHPS-CV con respecto a la P30, S30 y ET obtenida de trofozoitos cultivados en PHPS-SV.

9. PERSPECTIVAS

Como objetivo a largo plazo nos propondremos obtener información de cuál o cuáles son los componentes que están presentes en las vitaminas 107 de Diamond que sean los responsables para incrementar estos factores de virulencia evaluados en esta tesis. Se propone además determinar si algunos RNA-mensajeros en los trofozoitos se incrementan con la presencia de dichos componentes presentes en las vitaminas y poder determinar por biología molecular la presencia e identificación de los posibles RNA-mensajeros correspondientes.

10. BIBLIOGRAFÍA

Adler MW. 1981. Sexually transmitted diseases in a defined population of women. Br Med J.Vol.283.Pp.29 – 32

Azzam-W M. 2002. Vulvovaginitis por *Candida* spp. Y *Trichomonas vaginalis* en mujeres sexualmente activas. Invest Clin.Vol.43.Pp.3 – 13

Batista AL. Borges MT,2005. Trichomoniasis. Rev Panam Infect,Vol.7.Pp. 33 – 38

Beach DH. 1991. Phospholipid metabolism of cultured *Trichomonas vaginalis* and *Trichomonas foetus*. Mol Biochem Parasitol,Vol.44, Pp. 97-108

Benenson A. 1997 Tricomoniasis. En: Manual para elcontrol de las enfermedades transmisibles. Organización Panamericana de la Salud. pp 461-462

Bowden FJ., Garnett GP 2000. *Trichomonas vaginalis* epidemiology: parameterising and analysing a model of treatment. Sex Transm Inf.Vol.76.Pp. 248-256

Bromke BJ.1986. A serum-free lipid-supplemented medium for the growth of *Trichomonas vaginalis*. J Microbiol Methods.Vol.6.Pp. 55-59

Bunnell RE, Dahlberg L, Rolfs R, Ransom R, Gershman K, Farshy C. High prevalence and incidence of sexually transmitted diseases in urban adolescent females despite moderate risk behaviors. J Infect Dis 1999; 180:1624-31.

Carrada-Bravo T.2006. Tricomoniasis vaginal. Informe de un caso y revisión de la literatura. Rev Mex Patol Clin.Vol.53.Pp.151 – 156

Cates W. 1999. Estimates of the incidence and prevalence of sexually transmitted diseases in the United States. The American Social Health Association Panel. Sex Transm Dis 26:52-57.

Costamagna SR, Prado-Figueroa M. 2001. On the ultrastructure of *Trichomonas vaginalis*: cytoskeleton, endocytosis and hydrogenosomes. Parasitología today, 25(3):100-108

Costamagna SR, Prado-Figueroa M. 2001. Validación del examen fresco, coloraciones de May Grunwald-Giemsa y medios de cultivo para el diagnóstico de *Trichomonas vaginalis*. Parasitol día. Vol.25.Pp. 60 – 64

Cotch MF, Pastorek JG, Nugent RT, Hillier SL, Gibbs RS, Martin DH. *Trichomonas vaginalis* associated with low birth weight and preterm delivery. Sex Trans Dis 1997;24:353-60.

David BD, Dulbecco R, Eisen HN, Ginsberg HS, Word WB. 1973. Microbiology second Ed Herpe & Ron NY. Pp 632

Dennis, E.A. (1983). Phospholipases. In Boyer. P. (Ed). The Enzymes, Chap 9 Vol. XVI. Academic Press, New York,:Pp. 307-353

Diamond LS. 1968. Techniques of axenic cultivation of *Entamoeba histolytica* Schaudinn, 1903 and *E. histolytica*-like amoeba J. parasitol 54: 1047 – 156.

Diamond LS. 1987. In vitro cultivation of the trichomonadidae a state of the art review. Acta Universitatis Carolinae Biologica. Vol.30.Pp.221 – 228

Dias-Filho BP. 1995. Phospholipase c mediated release of neuraminidase from *Trichomonas foetus* cell surface. Parasitol Res. Vol.81.Pp.188-192

Dyer B. 1990. Phylum Zoomastigina Class Parabasalia. In: Handbook of Protoctista, Margulis L, Corliss JO, Melkonian M, Chapman DJ (eds). Boston: Massachussets, pp 252-258.

Egan ME, Lipsky MS.2000. Diagnosis of vaginitis.Am Fam.Physician. Vol.62.Pp. 1095-1104

Engbring J, Alderete JF. 1998. Characterization of *Trichomonas vaginalis* AP33 adhesin and cell surface interactive domains. Microbiology 144: 3011 – 3018.

Fiori P, Rappelli P, Rocchigiani A, Cappuccinelli 1993. *Trichomonas vaginalis* haemolysis: evidence of functional pores formation on red cell membranes. FEMS Microbiol Lett 247: 13 –18.

Fleisher JM, Senie RT, Minkoff H, Jaccard J. Condom use relative to knowledge of sexually transmitted disease prevention, method of birth control, and past or present infection. J Community Health 1994;140:1125-34.

Fousts AC, Kraus SJ. *Trichomonas vaginalis*: reevaluation of its clinical presentation and laboratory diagnosis. J Infect Dis 1980;141:137-43.

Garber GE.1987. Cell culture compared with broth detection of *Trichomonas vaginalis*. J Clin Microbiol.Vol.25.Pp. 1275 – 1279

Garber GE.2005. The laboratory diagnosis of *Trichomonas vaginalis*. Can J Infect Dis Med Microbiol.Vol.16.Pp. 35 – 38

García J,Castillo L, Bustos R. et al.1994 Diagnóstico de laboratorio de las infecciones del tracto genital femenino y masculino. En: Procedimientos técnicos de laboratorio clínico. Instituto de Salud Pública. pp 41-6.

Gilbert D. Vereecken A, Bosmans E. 2002; Definition of a type of abnormal vaginal flora that is distinct from bacterial vaginosis aerobic vaginitis. Int J Obst Gynaecol. 109: 34-43.

González-Garza MT, Castro-Garza J, Cruz-Vega DE, Vargas-Villarreal J, Carranza-Rosales P, Mata-Cárdenas BD, Siller-Campos L, Said-Fernández S. 2000. Entamoeba histolytica: diminution of erythrophagocytosis, phospholipase A₂ and hemolytic activities is related to virulence impairment in long-term axenic cultures. Exp Parasitol 96: 116 – 119.

Gorrell TE. 1985. Effect of culture medium iron content on the biochemical composition and metabolism of *Trichomonas vaginalis*. J Bacteriol. Vol. 161. Pp. 1228 – 1230

Hawthorne, S.N., Ansell, G.B. (1982) Phospholipids. Edición Elsevier Biomedical. Press Amsterdam, N.Y, Oxford. 313.

Heine P., McGregor JA. 1993. *Trichomonas vaginalis*: A reemerging pathogen. Clin Obstet Gynecol. Vol. 36. Pp. 137-144

Hill LVH, et al. 1986. Vaginitis: current microbiologic and clinical Concepts. Can Med Assoc J. Vol. 134. Pp. 321 – 331

Hook EW. 1999. *Trichomonas vaginalis* no longer a minor STD. Sex Transm Dis 26: 288 – 389.

Horton SN, Moran LA, Ochs RS, Rawn JD, Srimgeour KG. 1995. Bioquímica Ed Prentice –Hall Hispaoamericana pp 4-67

Hysmith, M. y Franson, R. C. (1982). Elevated levels of cellular and extracellular phospholipase from pathogenic *Naegleria fowleri*. Biochem. Biophys. Acta. 711: pp. 26-32.

Ibarra A, Saro G, Cabero MJ, Carrera C, Rodriguez JG. Actualización terapéutica de las enfermedades de transmisión sexual. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 1997;15:431-6.

Kiviat NB, Paavonen JA, Brockway J, Crichlow C, Brunham RC, Stevens CE. Cytologic manifestations of cervical and vaginal infections. Epithelial and inflammatory cellular changes. *JAMA* 1985;253:989-96.

Krieger JN. 1983. Beta-hemolytic activity of *Trichomonas vaginalis* correlates with virulence. *Infect Immun*, vol 41, pp.1291-1295

Krieger JN. 1985 Contact-dependent cytopathogenic mechanisms of *Trichomonas vaginalis*, *Infect Immun*, vol 50, pp.778-786

Laffita-Batista A, Toledo-Borges M. 2005. Trichomoniasis. *Rev Panam Infect*. Vol.7. Pp. 33 – 38

Levine, N.D., Carliss, J.O., Cox, F.E.G., Deroux, G., Grain, J., Honingerg, B.M., Leedale, G.F., Loeblich, A.R., Lin, D., Lom, J., Merinfeld, E.G., Page, F.C. Poljansky, G., Sprague, V., Vavra, J. And Walalace, F.G. (1980). A Newly Revised Classification of the Protozoa. *J. Protozool.* 7 (1) 37

Long-Krug SA, Fisher JK, Hygmith MR, Ravdin JI. 1985. Phospholipase A enzymes of *Entamoeba histolytica*: description and subcellular localization. *J Infect Dis* 152: 536 – 541.

Lubick K, Burgués DE. 2004. Purification and analysis of phospholipase A₂ –like factor of *Trichomonas vaginalis*. *Infect Immun* 72: 1284 – 1290.

Long-Krug SA, Fisher JK, Hygmith MR, Ravdin JI. 1985. Phospholipase A enzymes of *Entamoeba histolytica*: description and subcellular localization. J Infect Dis 152: 536 – 541.

Lowry OH, Rosenbrough NS, Farr AL, Randall RJ. 1951. Protein measurement with the folin reagent. J Biol Chem. 183: 265 – 275.

Lozano-Garza HG. 2000. Comparación de la actividad hemolítica, fosfolipásica y producción de abscesos hepáticos de *Entamoeba histolytica* cultivada en presencia y ausencia de vitaminas. Tesis de maestría. Facultad de Veterinaria y Zootecnia. UANL.

Lumsden WHR. 1966. Isolation, cultivation, low temperature preservation, and infectivity titration of *Trichomonas vaginalis*. Brit J Vener Dis. Vol.42. Pp. 145 – 154

Mabey D, Ackers J, Adu-Sarkodie Y. 2006. *Trichomonas vaginalis* infection. Sex Transm Infec. Vol.82. Pp. 26 – 27

Maciques-Rodríguez I, Alonso-Castellanos M. 2002. Diagnóstico y síntomas clínicos de la trichomoniasis vaginal. Rev. Cubana Obstet Ginecol. Vol.28. Pp. 93 – 99

Madigan MT, Martinko JM y Parker J. 1997. Broca Biology of Microorganisms. Eighth Edition. Pp 908, 942, 952. Prentice Hall. Upper Saddle River, NJ 07458.

Mark A, Klebanoff J, Christopher J, John C. Failure of metronidazole to prevent preterm delivery among pregnant women with asymptomatic *Trichomonas vaginalis* infection. N Engl J Med 2001;345:487-93.

Mason PR. 1976. Comparison of four techniques for the routine diagnosis of *Trichomonas vaginalis* infection. J Clin Path. Edition. Pp 154-157

Mata-Cárdenas BD. 1998. Determinación de la auxotrofia de *Entamoeba histolytica* para colesterol, fosfolípidos y ácidos grasos. Tesis de Doctorado. Facultad de Ciencias Biológicas UANL.

Mata-Cárdenas BD, Vargas-Villarreal J, Navarro-Marmolejo L, Saíd-Fernández S. 1998. Axenic Cultivation of *Trichomonas vaginalis* in a serum free medium. J. Parasitol. 84: 638-639.

McCormack WM, Evrard JR, Laughlin CF, Rosner B, Alpert S, Crockett VA. Sexually transmitted conditions among women college students. Am J Obstet Gynecol-1981;139:130-3.

Mitchell H.2004. Vaginal discharge causes, diagnosis and treatment.BMJ.Vol.328.Pp. 1306 – 1308

Moreno SNJ, Docampo R 1985. Mechanism of toxicity of nitro compounds used in the chemotherapy of trichomoniasis. Environ Health Perspec.Vol.64.Pp. 199 – 208

Neira PO. 2005. Frecuencia de infección por *Trichomonas vaginalis* en atención primaria de salud. Rev. Chil Obstet Ginecol.Vol.70.Pp. 147 – 151

Nicoletti N.1961. The problem of trichomoniasis of the lower genital tract in the female. Brit J Vener Dis.Vol.37.Pp.223 – 228

Opperdoes, F. R., y VanRoy, J. (1982). The phospholipase of *Trypanosoma cruzi* bloodstream form and cultured procyclics. Mol. Biochem. Parasitol. 5:pp. 309-319.

Organización Panamericana de la Salud. 1998. México. La Salud en las Américas, edición de 1998 [Online]. Disponible en: http://www.paho.org/Spanish/SHA/HIA_1998ed.htm

Owen MK, Clenney TL. 2004. Management of vaginitis. Am Fam Physician. Vol. 70. Pp. 2125-2132

Petrin D, Delgaty K, Bhatt R, Garber G. 1998. Clinical and Microbiological Aspects of *Trichomonas vaginalis*. Clin Microbiol Rev 1:300 – 317.

Pindak FF. 1986. Growth and cytopathogenicity of *Trichomonas vaginalis* in tissue cultures. J Clin Microbiol. Vol. 23. Pp. 672 – 678

Potamianos S., et al. 1992. Lysis of erythrocytes by *Trichomonas vaginalis*. Bioscience Reports, vol 12, pp. 387-395

Prasad, A. K., Das, S. R. y Sagar, P. (1982). Hemolysis: An in vitro model to investigate tissue necrotic activity of *Entamoeba histolytica*. Ind. J. Exptl. Biol. 20: 721-725.

Rendon-Maldonado JG, Castellano-Espinoza M, Gonzalez-Robles A, Martinez-Palomo A. 1998. *Trichomonas vaginalis*: in Vitro phagocytosis of lactobacilli, vaginal epithelial cells, leukocytes and erythrocytes. Exp Parasitol 89: 241 – 250.

Reyes V. 1992. Tricomoniasis. En: Parasitología Clínica. Eds. A. Atías pp 367 - 373 Editorial Mediterráneo.

Reyes H. Lynch B, Noemí I. et al. 1974. Estudio sobre *Trichomona vaginalis*, hongos y bacterias en muestras de flujo vaginal. Rev. Méd 102: 279-82.

Ris HW, Dodge RW. *Trichomonas* and yeast vaginitis in institutionalized adolescent girls. Wis Med J 1973; 72:150.

Rojas-R L. 2004. Comportamiento "in vivo de aislamientos de *Trichomonas vaginalis* utilizando ratones NMRI como modelo experimental. Rev Chil Infect.Vol.21.Pp. 179 – 185

Saíd-Fernández S. y López-Revilla, R. (1986). Free fatty acids generationed from endogenous phospholipids are the major heat-stable hemolytic factor of *Entamoeba histolytica*. Infect. Immun. 56: pp. 874-879.

Said-Fernández S, Vargas-Villarreal J, Cstro-Garza J, Mata-Cárdenas BD, Navarro-MArmolejo L, Lozano-Garza G, Martínez-Rodríguez H. 1988. PEHPS médium: an alternative for axenic cultivation of *Entamoeba histolytica* and *E. invadens*. Trans R Soc Trop Med Hyg. 82: 249 – 253.

Sagua H. Fuentes A, Raby M.1983. Diagnóstico de la trichomoniasis: Evaluación de técnicas de recolección y transporte de las muestras. Rev Méd; 11:909-12.

Saxena SB, Jenkins RR. Prevalence of *Trichomonas vaginalis* in men at high risk for sexually transmitted diseases. Sex Transm Dis 1991;18:138-42.

Schwebke JR, Burges D. 2004. Trichomoniasis. Clin Microbiol Rev.vol.17. pp. 794-803

Schwebke JR. 2002. Update of trichomoniasis. Sex Transm Inf 78: 378 —379
Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica. Epidemiología. No. 49, Vol. 23
Semana 49. del 3 -9 de Diciembre del 2006.

Shafir SC., Sorvillo FJ.2006. Viability of *Trichomonas vaginalis* in urine: epidemiologic and clinical implications. J Clin Microbiol.Vol 44, Pp. 3787-3789

Shuter J, Bell D, Graham D, Holbrook KA, Bellin EY. Rates and risk factors for trichomoniasis among pregnant inmates in New York City. Sex Transm Dis 1998;25:303-7.

Skipsky, J.P. y Barclay, M. (1969). Thin-Layer chromatography of lipids. En J.M. Lowenstein (ED). Methods in Enzymology.. Academic Press, 14: pp. 30-599.

Smith RF.1983. Viability of *Trichomonas vaginalis* in Vitro at four temperatures. J Clin Microbiol.Vol.18.Pp. 834 – 836

Smith RF.1986. Incubation time, second blind passage and cost considerations in the isolation of *Trichomonas vaginalis*. J Clin Microbiol.Vol.24.Pp. 139 – 140

Sorvillo F, Smith L, Kerndt P, Ash L. 2001. *Trichomonas vaginalis*, HIV, and African-Americans. Emerging Infect Dis 7(6): 927-932

Swygard H., et al 2004. Trichomoniasis: clinical manifestations, diagnosis and management. Sex Transm Inf.Vol 80. Pp. 91-95

Tawfik R, Elhoussieny A.2004. *Trichomonas vaginalis*. Organism profile. ASJOG.Vol.1.Pp. 107 – 109

Thomason JL. 1988. Comparison of four methods to detect *Trichomonas vaginalis*. J Clin Microbiol.Vol.26.Pp. 1869 – 1870

Van Den Bosch, H. (1980). Intracellular phospholipase A. Biochim. Biophys. Acta. 604: pp. 191.

Van Der Pol B. 2005. Prevalence, incidence, natural history, and response to treatment of *Trichomonas vaginalis* infection among adolescent women. Infect Dis,Vol.192.Pp. 2039-2044

Vargas-Villarreal J. 2005.*Trichomonas vaginalis*: identification of soluble and membrane-associated phospholipase A₁ and A₂ activities with direct and indirect haemolytic effects. J Parasitol. 5-11

Vargas-Villarreal J, Martínez-Rodríguez HG, Castro-Garza J, Mata-Cárdenas BD, González-Garza MT, Said-Fernández S. Identification of *Entamoeba histolytica* intracellular phospholipase A and lysophospholipase L₁ activities. *Parasitol Res* 81: 320 – 323.

Vargas-Villarreal J, Mata-Cárdenas BD, González-Salazar F, Lozano-Garza HG, Cortes-Gutierrez EI, Palacios-Corona R, Martínez-Rodríguez HG, Ramírez-Bon E, Said-Fernández S. 2003. *Trichomonas vaginalis*: identification of a phospholipase A-dependent hemolytic activity in a vesicular subcellular fraction. *J Parasitol* 89: 105 –112.

Vargas-Villarreal, J and Said-Fernández S. (1984). *Entamoeba histolytica*: Cytolytic Activity of Cell-Free Trophozoites Extract Upon Cells. *Arch. Invest. Med.* 15: pp. 1-12.

Vargas-Villarreal J, Mata-Cárdenas BD, Palacios-Corona R, González-Salazar F, Cortes-Gutierrez EI, Martínez-Rodríguez HG, Said-Fernández S. 2005. *Trichomonas vaginalis*: identification of soluble and membrane-associated phospholipase A₁ and A₂ activities with direct and indirect hemolytic effects. *J Parasitol* 91: 5 –11.

Van Den Bosch H. 1980. Intracellular phospholipase A. *Biochem Biophys Acta.* 604: 191 – 246.

Villalobos D.1995 *Enfermedades de Transmisión Sexual*. Proyecto ETS . Ministerio de Salud.

Wainszlebaum M, Isola E, Wilkowsky S, Cannat JJ, Florin-Christensen J. 2001. Lysosomal phospholipase A₁ in *Trypanosoma cruzi*: an enzyme with a possible role in pathogenesis of Chagas disease. *Biochem J* 355: 765 – 770.

Wasley GD, Rayner CFA.1970. Preservation of *Trichomonas vaginalis* in liquid nitrogen.Brit J Vener Dis.Vol46.Pp. 323 – 325

Weinberg JG, Whittington MJ.1957. A culture medium for *Trichomonas vaginalis* Donne and species of *Candida*. J Clin Path.Vol.10.Pp. 327 – 32

Wolner-Hanssen P, Krieger J, Stevens CE, Kiviat NB, Koutsky L, Critchlow C. Clinical manifestation of vaginal trichomoniasis. JAMA 1989;261:571-6.